Funktionelle Erkennungsbereiche für zytotoxische T-Zellen auf H-2 Molekülen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

Wolfgang Kuon
aus Ahlen/Westf.

1984

Funktionelle Erkennungsbereiche für zytotoxische T-Zellen auf H-2 Molekülen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

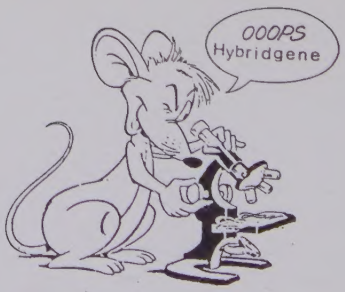
Wolfgang Kuon
aus Ahlen/Westf.

1984

Tag der mündlichen Prüfung	01. August 1984
Dekan	Prof. Dr. E. Kulzer
1. Berichterstatter	Prof. Dr. G.J. Hämmerling
2. Berichterstatter	Prof. Dr. W. Bessler

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45

Meinen Eltern gewidmet



Für C.

Abkürzungen

N, C1, C2	Nomenklatur für die äußeren Domänen des
$\alpha 1$ $\alpha 2$ $\alpha 3$	H-2 Moleküls
Ag	Antigen
AK	Antikörper
Allo-CTL(s)	Alloreaktive zytotoxische T-Lymphozyt(en)
BSA	Rinderserumalbumin
CML	Zellvermittelte Zytotoxizität
ConA	Concanavalin A
CPM	Radioaktive Counts/Minute
CRIA	Zellgebundener Radioaktiver Bindungstest
CMV	Choriomeningitis Virus
CTL(s)	Zytotoxische T-Zelle(n)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTH	Allergische Reaktion vom verzögerten Typ
FACS	Fluoreszenz-Aktivierter-Zell-Sortierer
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiozyanat
H-2	Haupthistokpmpatibilitätskomplex der Maus
HLA	Haupthistokompatib.-Komplex des Menschen
HY	Männliches Zelloberflächenantigen
i.p.	intraperitoneal
Major H-Antigene	Starke Transplantationsantigene
Minor "	Schwache Transplantationsantigene
mAK	monoklonale Antikörper
MHC	Haupthistokompatibilitäts-Komplex
MLC	Gemischte Lymphozytenkultur
Prot.A	Protein A von Bakterium Stapphylococcus aureus
RαMIg	Immunglobulin vom Kaninchen mit Spezifität
GαMig	für Maus-Immunglobulin (bzw. Ziege)
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TK^+	Thymidinkinase (positiv)
TM	Transmembran-Teil
TCGF	T-ZellWachstumsfaktor(en)
VSV	Vesikular Stromatitis Virus

INHALTSVERZEICHNIS

Verzeichnis der Abkürzungen

		Seite
1	Einleitung	1
1.1	Biomembranen und Immunsystem	1
1.2	Der MHC-Komplex	2
1.3	Erkennung und biologische Funktion von MHC-Antigenen	10
1.4	Die molekulare Struktur des T-Zellrezeptors	12
1.5	Fragestellung	15
2	Material und Methoden	17
2.1	Labormaterial	17
2.1.1	Chemikalien	17
2.1.1.1	Zellpuffer	17
2.1.1.2	Medien	18
2.1.1.3	Materialien	18
2.2	Versuchstiere	18
2.2.1	Mäuse	18
2.2.1.1	Wildtyp-und Rekombinantenmäuse	18
2.2.1.2	Mutantenmäuse	19
2.2.2	Ratten	20
2.3	Zellinien	20
2.3.1	Tumorlinien	20
2.3.2	H-2 transfizierte Maus-Fibroblastenlinien	21
2.4	Seren	21
2.4.1	Föetales Kälberserum	21
2.4.2	Antiseren	21
2.5	Monoklonale Antikörper	21
2.5.1	Gewinnung monoklonaler Antikörper aus Ascites	21

		Seite
2.5.2	Ammonsulfat-Fällung	21
2.5.3	Monoklonale Antikörper	22
2.5.4	Markierung von Antikörpern mit ^{125}Jod	23
2.5.5	Der zellgebundene radioaktive Bindungstest (CRIA)	23
2.5.6	Markierung von Zellen mit FITC konjugierten Antikörpern	24
2.5.7	Immunpräzipitation	25
2.6	Präparation lymphoider Zellen	26
2.6.1	Milzzellen-Präparation	26
2.6.2	Präparation von Peritonealexudatzellen	26
2.6.3	Ficoll-Trennung	27
2.7	Kultursysteme	27
2.7.1	Allgemeine Kulturbedingungen	27
2.7.2	Makrokulturen (Bulk Culture)	27
2.7.2.1	Die gemischte Lymphozyten-Kultur (MLC)	27
2.7.2.2	Herstellung von ConA Blasten	28
2.7.2.3	Markierung von Zellen mit ^{51}Cr	28
2.7.2.4	Der zellvermittelte Massen-Zytotoxizitätstest (^{51}Cr-Freisetzungs-Test)	29
2.7.2.5	Targetinhibition von CTLs aus Massenkulturen mit monoklonalen Antikörpern	30
2.7.3	Mikrokulturen	30
2.7.3.1	Gewinnung von T-Zell Wachstumsfaktor(en) aus Ratten ConA-Überstand	30
2.7.3.2	Grenzverdünnungsexperimente (Limiting Dilution)	31
2.7.3.3	Limiting Dilution Zytotoxizitätstest	31
2.7.3.4	Bestimmung der CTL-Vorläuferfrequenz	32
2.7.3.5	Expansion von CTLs	32
2.7.3.6	Targetinhibition von CTLs aus Mikro - kulturen mit monoklonalen Antikörpern	33
2.8	Klonierung und Transfektion von H-2 Genen	33
2.8.1	Klonierte H-2 Gene	
2.8.2	DNA-Transfektion und Expression in 1T22-6 ($H\text{-}2^q$) Maus-Fibroblastenzellen	34

		Seite
2.8.3	Konstruktion von H-2K^d-K^k und H-2K^b-K^k Hybridgenen	34
3	Ergebnisse	39
3.1	Charakterisierung der H-2K^b spez. monoklonalen Antikörper im CRIA, FACS und durch Immunpräzipitation	39
3.1.1	Titration der Ammonsulfat gefällten anti-H-2K^b Antikörper im zellgebundenen radioaktiven Bindungstest (CRIA)	39
3.2	Quantitative Bestimmung der gefällten anti H-2K^b Antikörper im FACS	44
3.3	Immunpräzipitation der H-2K^b Antikörper	47
3.4	Untersuchung auf unspezifische Inhibition von monoklonalen H-2K^b AK auf die Lyse von H-2^d Targets durch anti H-2^d spez. CTLs	49
3.5	Vergleichende Analysen von Erkennungsregionen für mAK und CTLs in Targetinhibitionsexperimenten	53
3.5.1	Erkennungsregionen von H-2K^b Antikörpern auf definierten Epitop-Regionen des H-2K^b Moleküls	53
3.5.2	Erkennungsregionen für alloreaktive CTLs	56
3.5.3	Erkennungsbereiche für anti H-2K^b (Minor) restringierte zytotoxische T-Zellen	63
3.6	Analyse von H-2K^{bm} Mutanten	67
3.6.1	Lokalisierung von H-2K^b AK-Determinanten auf dem H-2K^b Molekül	67
3.6.2	Bestimmung von Erkennungsbereichen für zytotoxische T-Zellen aus Massenkulturen auf bm-Mutantenzellen	71
3.6.3	Ergebnisse der Inhibition von bm-Mutanten CTLs	73
3.7	Limiting Dilution Analysen	75
3.7.1	Limiting Dilution von bm-Mutanten CTLs und Analyse der CTL Klone mit Targetinhibitionsexperimenten	75

		Seite
3.7.2	Bestimmung der klonalen Frequenz der bm-Mutanten CTLs	79
3.7.3	Ergebnisse der Targetinhibition von Mutanten CTL Klonen mit monoklonalen Antikörpern	82
3.8	Analyse von Erkennungsbereichen für zytotoxische T-Zellen mit Hilfe genetisch modifizierter H-2K^d, H-2K^k und H-2K^b Antigene	85
3.8.1	Vorteil der Methode	85
3.8.2	Lyse von H-2K^d-K^k Hybridgen transfizierten (H-2^q) Maus-Fibroblastenzellen durch alloreaktive CTLs	85
3.8.3	Lyse von H-2K^b-K^k Hybridgen transfizierten H-2^q Maus-Fibroblastenzellen durch alloreaktive CTLs	89
3.9	Limiting Dilution: Lyse von H-2K^d-K^k Hybridmolekül tragenden Targetzellen durch anti - H-2K^d und anti-H-2K^k spezifische CTL Klone	91
3.9.1	Darstellung der klonalen Frequenzen	91
3.9.2	Reaktion von anti H-2K^d CTL Klonen mit H-2K^d-K^k Hybridmolekülen	93
3.9.3	Reaktion von anti H-2K^k CTL Klonen mit H-2K^d-K^k Hybridmolekülen	96
4	Diskussion	99
4.1	Quantitative und qualitative Antikörperbestimmung	99
4.2	Erörterung der Targetinhibitionsexperimente mit CTL Massenkulturen	101
4.3	Limiting Dilution und Targetinhibition	105
4.4	Hybridgen-Analysen	106
4.5	Weitere Perspeptiven	113
5	Zusammenfassung	114
6	Literaturverzeichnis	117

1 Einleitung

1.1 Biomembranen und Immunsystem

Aufgabe des Immunsystems in einem Organismus ist es, die biologische Unversehrtheit des Individuums zu gewährleisten. Eingedrungene Fremdsubstanzen - Antigene - z.B. Bakterien oder Viren, wie auch im Organismus selbst entstandene Mutationsprodukte müssen erkannt und gegebenenfalls eliminiert werden.

Das Immunsystem ist Ausdruck eines fundamentalen biologischen Prinzips, das bereits seit den ersten Entwicklungsstufen des Lebens wirksam ist. So scheint die Natur von Beginn an bestrebt gewesen zu sein, Ordnungszustände innerhalb der Materie herzustellen (Glasnsdorf und Prigogine, 1977; Nicolis und Prigogine , 1971; Haken 1978; Eigen und Winkler, 1975; Riedl 1975;). Die Bildung geordneter, nicht mehr regelloser Strukturen war verbunden mit dem Bestreben zur Abgrenzung und Selektivität. Prozesse dieser Art begannen bereits auf der präbiotischen Erde, auf der Stufe einfachster Moleküle (Eigen und Schuster, 1977). Ein entscheidendes Ergebnis dieser über Jahrmillionen andauernden chemischen und biologischen Evolution war die Ausbildung von Biomembranen (Singer und Nicolson, 1972). Biomembranen sind das Ergebnis eines Prozesses, in dessen Verlauf sich die Materie zu immer komplexeren Formen selbst organisierte (Eigen 1971).

Die Ausbildung noch so primitiver Membranen, einer Grundvoraussetzung allen weiteren Lebens, führte zu einem wichtigen evolutiven Schritt: die immer komplexer werdenden Lebensformen entwickelten die Fähigkeit, eine Unterscheidung zwischen Eigen-Strukturen und Fremd-Strukturen treffen zu können. Das Unterscheidungsvermögen zwischen "Selbst" und "Nicht-Selbst"

beruht, wie wir heute wissen, ganz wesentlich auf der Erkennung spezifischer Strukturen auf der Zellmembranoberfläche. Dieser Erkennungsprozeß ist eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Immunantwort (Klein et al., 1981).

Bereits auf der Stufe biologisch noch "einfach" strukturierter Organismen, wie den Invertebraten, z.B. den Spongidae, den Coelenteraten, Echinodermen, Anneliden und Protochordaten scheint es ein umfangreiches Zell-Zelloberflächenerkennungssystem zu geben. Alle diese Tierstämme zeigen einen ausgeprägten allogeneischen Polymorphismus(Cooper 1979; Hildeman 1979; Hildeman et al., 1979;). Im Laufe der Evolution scheint sich die Fähigkeit zur Immunantwort über die Invertebraten zu den Vertebraten hin zu einem immer komplexeren System entwickelt zu haben, dessen Charakter dem eines immunologischen Netzwerkes gleicht (Jerne 1973,1974; Golub, 1980).

Ein komplexes Immunsystem ist ein Hauptmerkmal der Wirbeltiere. Bereits während der frühen prä- und postnatalen Phase ist der Vertebratenorganismus in der Lage, zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen diskriminieren zu können (v. Boehmer und Adams, 1973). Die Fähigkeit, gegen körpereigene Strukturen normalerweise nicht mit einer Immunantwort zu reagieren, wird als immunologische Toleranz bezeichnet (Billingham et al., 1953).

1.2 Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC oder H-2)

Wie zwischen Fremd- und Eigenstrukturen diskriminiert wird, ist bislang weitgehend unverstanden. Einzig im Falle der Säugetiere und einiger Invertebraten beginnt man zu verstehen, wie diese Prozesse ablaufen.

Das am besten untersuchte Zell-Zellerkennungssystem ist der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC oder H-2) der Maus (Gorer 1937; Klein 1975). Das analoge System beim Men - schen wird als HLA-System bezeichnet (Dausset 1981). Eine Schlüsselrolle bei der Unterscheidung von "Selbst" und "Fremd" spielen dabei die im Thymus gereiften T-Lymphozyten, sowie die im Knochenmark gereiften B-Lymphozyten und Makrophagen. Die vom MHC-Komplex kodierten Zellmembranproteine greifen entscheidend in die Wechselwirkungen dieser Zellpopulationen ein und lenken so die Immunantwort (Benacerraf 1981). So steuern die Membranproteine des MHC z.B. die Erkennung von Zielzellen für zytotoxische T-Lymphozyten, die Interaktion zwischen T-und B-Lymphozyten, sowie die Antigenpräsentation durch Makrophagen an T-Helferzellen (Klein et al., 1981; Kindred und Shreffler, 1972).
Da es ähnliche Antigensysteme bei allen bisher untersuchten Säugetieren und sogar in einigen Invertebraten gibt, wird angenommen, daß Histokompatibilitätsantigene ein grundsätzliches Erkennungssystem von "Selbst" und "Fremd" definieren (Götze 1977; Du Pasquier, 1976).
Die zum Teil hochpolymorphen Gene des H-2 komplexes der Maus liegen auf dem Chromosom 17 (Abb. 1). Die Zahl der Gene variiert je nach Mausstamm zwischen 25 und 35 Genen. Die Kartierung der Gene wurde möglich durch Untersuchungen mit inge - züchteten, rekombinanten oder kongenen Mausstämmen (Klein 1975; Snell 1981;). Kongene Mausstämme unterscheiden sich genetisch nur noch in bestimmten Allelen des H-2 Komplexes. Die Allele in einem Individuum für einen bestimmten H-2 Typ bezeichnet man als den Haplotyp.
Aufgrund serologischer und biochemischer Charakterisierung der H-2 Moleküle werden die Gene des H-2 Komplexes in zwei Hauptgruppen unterteilt. Man spricht von Klasse I und Klasse II Genen (KLein 1979). Eine dritte Klasse von Genen innerhalb des H-2 kodieren für Serumproteine und Komplementfaktoren (Shreffler und Owen, 1963;).

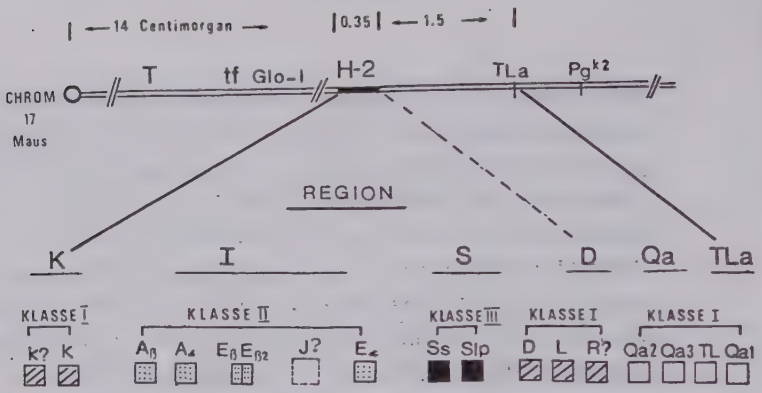


Abb. 1 Genetische und serologische Karte des H-2 Komplexes der Maus

Dargestellt ist die relative Lage des H-2 Komplexes auf dem Chromosom 17 der Maus. Die Darstellung berücksichtigt die neuere Einteilung des H-2 Komplexes nach Klein und Figueroa 1981, sowie die exp.Analysen von Steinmetz et al., 1982 und von Rose und Cullen, 1981.(siehe auch Lee,J. und Trowsdale,J., 1983)

? : die Existenz dieser Loci ist nicht eindeutig sicher.
Im Falle des J-Locus gibt es bisher nur serologische Hinweise für ein Genprodukt. Steinmetz et al. ,1982 fanden auch nach DNA-Sequenzierung keine Evidenz für die genetische Existenz eines J-Locus. Jüngste Berichte weisen auf eine andere Lösung des Problems (Hayes et al.,1984).

K, D, L : kodieren für die klassischen Transplantationsantigene.

Qa-2,3 , Tla und Qa-1 : kodieren für Moleküle der Klasse I. Ihre Expression ist aber beschränkt auf bestimmte haematopoietische Zellen.

A und E-Loci : kodieren für Moleküle der Klasse II.

$E_{\beta 2}$: stellt ein Pseudogen dar (Steinmetz et al., 1982)

Ss und Slp : kodieren für Moleküle der Klasse III. Es handelt sich dabei um Komplement-Komponenten.

T, tf, Glo-I, Pgk_2 : weitere Genmarker auf Chromosom 17(Klein et al., 1983)

o: symbolisiert die Lage des Zentromers

Gene der Klasse I umfassen die klassischen Transplantationsantigene der H-2K, H-2D und H-2L Loci, die auf allen Geweben exprimiert werden. K, D und L-Loci sind die am stärksten polymorphen Gene, die bisher in eukaryontischen Zellen gefunden wurden. Allein für H-2K und H-2D wurden bisher mehr als 100 verschiedene Allele nachgewiesen Klein 1978). Wie dieser hohe Polymorphismus zu erklären ist, konnte bislang noch nicht völlig geklärt werden (Klein 1980; Shinohara 1981; Scofield 1982).
Die zweite Gruppe der Klasse I H-2 Moleküle besteht aus hämatopoietischen Differenzierungsantigenen, die von Qa und TLa Genen kodiert werden. Diese H-2 Moleküle sind strukturell eng mit den klassischen K, D und L-Antigen verwandt (Davies et al., 1967; Vitetta et al., 1972; Soloski et al.; 1981 und 1982; McIntyre et al., 1982; Winoto et al., 1983), werden aber nur auf bestimmten Subpopulationen von Lymphozyten exprimiert (Flaherty et al.,1978; Hämmerling et al., 1979).

Die biologische Bedeutung der Qa und TLa Antigene ist nicht bekannt. Spekuliert wird im Augenblick darüber, ob TLa und Qa Gene ein Donor Reservoir an Gensequenzen darstellen, die den Polymorphismus der Klasse I K und D Loci erhöhen, indem in unidirektioneller Weise, d.h. von Qa/TLa nach K und D durch Genkonversion kurze Gensequenzen ausgetauscht werden können, wobei der Mechanismus unbekannt ist (Weiss et al., 1983; Robertson 1982).

Klasse I Gene kodieren für Polypeptidketten mit einem Molekulargewicht von 38 000 Dalton. Vor dem Einbau in die Zellmembran werden die Polypeptidketten glykosyliert. Ihr Molekulargewicht beträgt danach 45 000 Dalton. Steinmetz et al., 1982 wiesen in Balb/c Mäusen mindestens 36 Klasse I Gene nach.

31 davon kodierten in den Regionen Qa-2,3 und TLa. Je zwei Gene wurden für die K und L-Region lokalisiert. Bei den beiden zusätzlichen Genen in K und L handelte es sich aber offensichtlich um Pseudogene, da sie nicht auf der Zellmembranoberfläche exprimiert wurden (Hood et al., 1983). Ein weiteres Gen wurde für die D Region bestimmt.

Die Klasse I Polypeptidkette besteht aus fünf unterschiedlichen Regionen, drei sog. extrazellulären Domänen, einer kurzen Domäne, welche das Molekül in der Plasmamembran verankert und einer sehr kurzen Sequenz, die in das Zytoplasma hineinreicht(Abb. 2).
Jede der drei äußeren Domänen ist etwa 90 Aminosäuren lang. Der äußerste Abschnitt wird als N-terminale oder α_1-Kette bezeichnet, die beiden anderen Domänen als C1 oder α_2 und C2 oder α_3. Träger der allogenen Determinanten sind die Domänen α_1 und α_2.
Cysteinreste in den Domänen α_2 und α_3 bilden je eine Disulfidbrücke. An die α_3 Domäne dieses Glykoproteins ist nichtkovalent ein kleines Polypeptid, $ß_2$Mikroglobulin mit einem Molekulargewicht von 12 000 assoziiert. Das Gen für dieses Polypeptid liegt auf Chromosom 2 (Michaelson 1981).
$ß_2$Mikroglobulin und die α_3 Domäne zeichnen sich durch starke genetische Homologie aus und stimmen darüberhinaus sehr stark in ihrer Primärstruktur mit dem konstanten Teil von Immunglobulinmolekülen überein (Steinmetz et al., 1981). Das legt die Vermutung nahe, daß es einen gemeinsamen Ursprung von MHC-Genen und Immunglobulin-Genen gibt.

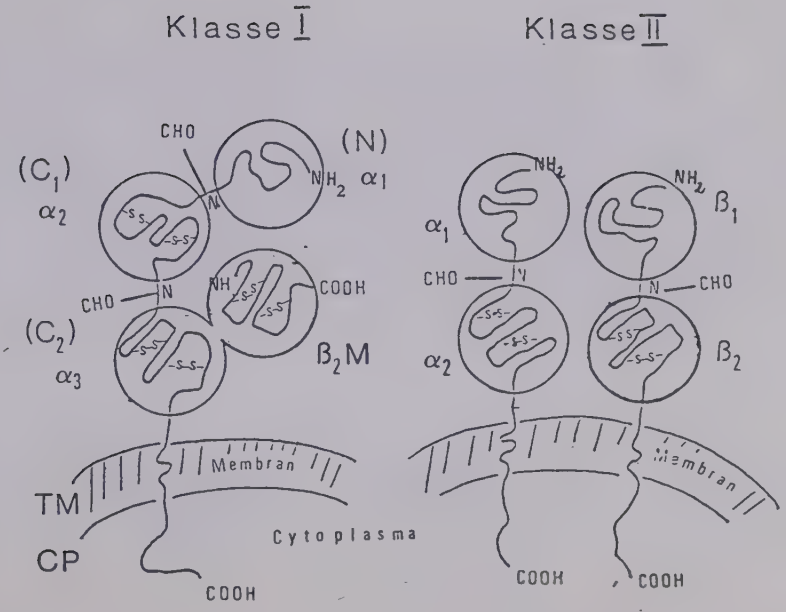


Abb. 2 Schematische Darstellung der Klasse I und II Moleküle in der Zellmembran (nach Coligan et al., 1981 und Hood et al.,1982 und 1983)

N (α_1): α-Kette des H-2 Moleküls
C1(α_2): erste,äußerste Domäne
C2(α_3): zweite,äußere Domäne
: dritte, äußere Domäne
TM : Transmembran-Teil
CP : Cytoplasmatischer Teil
ß2M : ß2-Mikroglobulin, assoziiert mit der C2 Domäne des Klasse I Moleküls

ß : ß-Kette des H-2 Moleküls
ß1 : erste, äußerste Domäne des Klasse II Moleküls
ß2 : zweite, äußere Domäne
NH_2 : N-Terminus
COOH : C-Terminus
CHO : Carbohydrat
S-S : Disulphidbrücke

Aufgrund der Sequenz von cDNA Klonen ist bekannt, daß die H-2 Moleküle der Klasse I genau die Exon/Intron-Struktur der Gene widerspiegeln (Steinmett al., 1981; Kvist et al., 1983; Malissen et al., 1982). Von den 8 Exons kodiert das erste für die Signalsequenz (S), die drei folgenden für die drei externen Domänen α_1 , α_2 und α_3, Exon 5 für den Transmembranteil (TM), Exon 6, 7,und 8 für die drei kurzen zytoplasmatischen Domänen und für die 3'-nichttranslatierende Region.(Abb. 3)

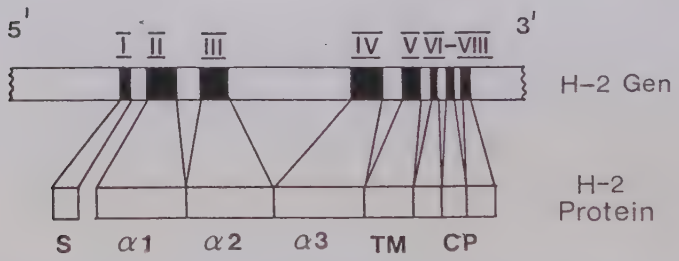


Abb. 3 Exon/Intron Struktur eines H-2 Gens und Transkription in Protein durch "Splicing" der Intronstrukturen

Bei den Molekülen der Klasse II (Kaufmann et al.,1984; Gonwa et al., 1983;) handelt es sich um Heterodimere. Diese Membranproteine bestehen aus einer α-und einer ß-Kette, die von den Genen des H-2 Komplexes kodiert werden. Die Genregion auf dem Chromosom 17 bezeichnet man als I-Region, die ihrerseits aus unterschiedlichen Loci besteht. Die α-Kette des Klasse II Moleküls hat ein Molekulargewicht von 33 000 Dalton, die ß-Kette von 28 000 Dalton, was auf unterschiedliche Kettenlänge und Glykosylierungsmuster zurückzuführen ist.

Im Unterschied zu den Molekülen der Klasse I bestehen die Klasse II Moleküle aus nur je zwei extrazellulären Domänen, $\alpha 1$ und $\alpha 2$, ß1 und ß2. $ß_2$Mikroglobulin gibt es bei den Ia- oder Klasse II Molekülen nicht. Ansonsten gleicht der strukturelle Aufbau der Klasse II Moleküle sehr stark denen der Klasse I. Die Moleküle werden ebenfalls in der Zellmembran und im Zytoplasma verankert. Die von den verschiedenen Exons kodierten Aminosäuresequenzen entsprechen längenmäßig etwa denen der Klasse I Moleküle (Hood et al., 1983). Interessant und wahrscheinlich von Bedeutung ist, daß sowohl Klasse I, wie auch Klasse II Moleküle im Endeffekt auf 4 extrazelluläre Domänen kommen (Abb 2).

1.3 Erkennung und biologische Funktion von MHC-Antigenen .

Die Produkte des MHC, die Histokompatibilitätsantigene, sind die wesentlichen Erkennungsstrukturen immunkompetenter Zellen, respektive T-Zellen und Makrophagen.
Unterschiede von H-2 Antigen auf Zellgeweben führen zu starken Alloreaktionen, die mit der Gewebezerstörung durch zytotoxische T-Zellen enden. Allotransplantate werden in der Regel innerhalb von 7-12 Tagen abgestoßen. Reaktionen dieser Art sind vor allem auf MHC-Gene der Klasse I zurückzuführen, welche vom K,D und L-Locus kodiert werden. Im Gegensatz zu diesen als starke (Major) Transplantationsantigene bezeichneten Membranmolekülen gibt es auch sog. schwache (Minor) Antigene, deren Gene nicht allein auf Chromosom 17 beschränkt sind, sondern sich über das gesamte Mausgenom verteilen. Gewebe, die sich nur in Minor-Antigenen unterscheiden werden von Empfängermäusen wesentlich langsamer abgestoßen, ungefähr erst nach drei Wochen.
Untersuchungen dieser Art haben zur Aufdeckung des wohl wichtigsten Phänomens im Zusammenhang mit MHC-Antigenen geführt, der sog. MHC-Restriktion (Zinkernagel und Doherty 1974, 1975) MHC-Restriktion im Zusammenhang mit dem H-2 System oder HLA-System bedeutet, daß T-Zellen fremdes Antigen, z.B. chemisch modifizierte Antigene, Virusantigene oder Tumorantigene nur dann erkennen, wenn sie gleichzeitig eigene, syngene MHC-Strukturen auf der Zellmembranoberfläche sehen. Mit anderen Worten, Fremdstrukturen werden nur erkannt und zerstört in Assoziation mit Eigenstrukturen (Zinkernagel und Doherty 1979).
Diese gleichzeitige Erkennung von "Fremd" und "Eigen" gilt nicht nur auf der Stufe der Lyse durch zytotoxische T-Zellen, sondern erfolgt bereits auf der ersten Stufe, d.h. der Präsentation des Fremdantigens durch Makrophagen an T-Helferzellen. Während zytotoxische T-Zellen (T_c) Fremdantigen nur in Verbindung mit Klasse I MHC-Strukturen erkennen können,wobei

letztere vom K, D u. L-Locus kodiert werden, erkennen T-Helferzellen (T_H) Fremdantigen nur in Assoziation mit Klasse II MHC-Strukturen, also Produkten der I-Region. Erst dieser Erkennungsvorgang stimuliert die T-Helferzellen zur Proliferation bzw. befähigt sie, offenbar ein Signal an die B-Zellen abzugeben, wodurch auch die Antikörperproduktion durch die B-Zellen in Gang kommt.
MHC-Strukturen der Klasse II steuern also sowohl den Ablauf von zellulären, als auch den von humoralen Immunreaktionen. Sie werden häufig auch als "Immunresponse-Gene" bezeichnet (Benacerraf 1981). Klasse II Gene steuern darüberhinaus DTH-Reaktionen und die Funktion von T-Suppressor-Zellen (T_S).
Soweit bislang bekannt ist, möglicherweise bis auf einige Ausnahmen (Fischer-Lindahl und Hausman 1980), unterliegt die Erkennung aller Fremdantigene, einschließlich Minor - Antigenen (Bevan 1975) und HY (Simpson und Gordon 1977) der MHC-Restriktion.
Um so erstaunlicher ist es, daß trotz dieser umfangreichen Kenntnisse der Funktion und Bedeutung von Klasse I und II Molekülen bislang weder die antigene Struktur der H-2 Moleküle bekannt ist, noch wo auf dem Molekül die biologisch aktiven Bereiche konzentriert sind. Von vielen biologischen Molekülen, wie z.B. Antikörpern, Enzymen, Hormonen etc. ist bekannt, daß sie ihre spezifischen Funktionen über spezielle, biologisch aktive Bereiche auf dem Eiweißmolekül ausüben. Auch MHC-Antigene bestehen aus verschiedenen Domänen, auf denen solche funktionellen Bereiche vermutet werden, Be - reiche , die z.B. wichtig sind als Erkennungsstrukturen für das Immunsystem, wie etwa für Antikörper und zytotoxische T-Zellen.

1.4 Die molekulare Struktur des T-Zellrezeptors

Wie sieht die molekulare Struktur des T-Zellrezeptors aus? Dies ist eine der am intensivsten diskutierten Fragen der Immunologie der letzten zehn Jahre. Eine Klärung dieses Problems würde auch zum Verständnis des Mechanismus der MHC-Restriktion führen.

Zwei Hauptmodelle der T-Zellerkennung werden im wesentlichen diskutiert: Die erste Hypothese, als " Dual Recognition " bekannt, postuliert das Vorhandensein von zwei Rezeptoren. Ein Rezeptor soll danach das Fremdantigen erkennen, während der zweite Rezeptor die eigene Selbst-MHC-Struktur erkennt (Abb. 4a; Blanden und Ada, 1978).

Die zweite, sog. " Altered Self " Hypothese nimmt dagegen an, daß H-2 Antigen und Fremdantigen einen neuen physikalischen Komplex (durch Konformationsänderung?) bilden, der dann vom T-Zellrezeptor erkannt wird (Abb. 4b; Zinkernagel und Doherty, 1974).

Letzteres Modell paßt zwar gut zu funktionellen Tests (Matzinger et al., 1981), aber bisher konnten noch keine bio - chemischen Daten diese Vorstellung erhärten.

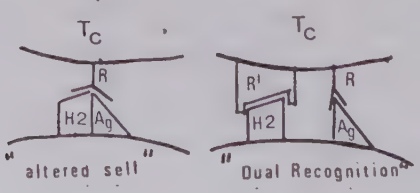


Abb. 4a Abb. 4b

Zwei Modelle der Antigen-Erkennung durch zytotoxische T-Zellen.
Abb. 4a: H-2"Selbst"-Antigen und "Fremd"-Antigen(Ag) bilden einen neuen Komplex, der von einem Rezeptor (R) erkannt wird.("altered self" Modell)
Abb. 4b: H-2"Selbst"-Antigen und "Fremd"-Antigen(Ag) werden getrennt durch zwei Rezeptoren, R_I für "Selbst-H-2", R für "Fremd-Ag",erkannt (Dual Recognition Modell).

Inzwischen haben mehrere Gruppen monoklonale Antikörper isoliert, die T-Zell spezifisch sind und diese in ihren Funktionen inhibieren. Die Antikörper binden offenbar mit dem Antigen spezifischen T-Zellrezeptor. So isolierten Haskins et al. , 1983 einen spezifischen mAK, der an T-Helferzellhybride bindet und diese daran hindert , auf ein bestimmtes Antigen, in diesem Fall Ovalbumin plus ein bestimmtes MHC Klasse II Molekül zu antworten. Lancki et al., 1983 beschreiben einen Antikörper, der spezifisch mit Killer-T-Zellen der Maus reagiert , während Meuer et al. 1983a einen solchen Killer spezifischen Antikörper für menschliche T-Zellen isolierten.
Alle diese Antikörper präzipitieren Zelloberflächenproteine, denen eine sehr ähnliche Struktur gemeinsam ist. Das präzipitierte Molekül bestand aus zwei Polypeptidketten, die über zwei Disulfidbrücken zusammengehalten wurden. Jede Polypeptidkette besaß ein Molekulargewicht von 39 und 51 Kilodalton (Allison et al., 1982; Haskins et al., 1983; Meuer et al.,1983b). Eingehende"Peptid map"Untersuchungen von Polypeptiden unterschiedlicher T-Zell Klone wiesen darüberhinaus gewisse Variabilität der Antigen-Rezeptoren auf (Reinherz et al., 1983; Kappler et al., 1983; Acuto et al., 1983). Inzwischen geht die weitgehend einhellige Meinung dahin, daß es sich bei dem Antigen spezifischen T - Zellrezeptormolekül um ein Polypeptid-Dimer von ungefähr 40 000 und 43 000 Dalton handelt.

Eine andere wichtige Frage bezüglich des T-Zellrezeptors ist die, inwieweit die Struktur des Rezeptors mit der von Immunglobulinmolekülen übereinstimmt. Dazu erschienen jüngst drei Arbeiten (Yanagi et al., 1984; Hedrick et al., 1984; Hedrick et al., 1984). Den Autoren nach soll mindestens eine der beiden Ketten des T-Zellrezeptors sehr der leichten Kette des Immunglobulinmoleküls ähnlich sehen.

Abschließend soll ein Modell für die neuere Vorstellung vom T-Zellrezeptor vorgestellt werden, im Vergleich mit MHC-Strukturen und Immunglobulin.

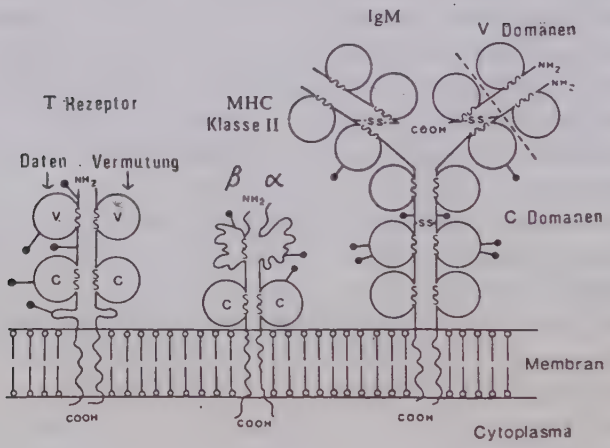


Abb. 5 (nach Williams,A.F., Nature 308, 1984)

Modell für eine vermutete T-Zellrezeptorstruktur, im Vergleich mit Klasse II Antigen und der IgM - Struktur

V-Kreise : bedeuten, Ähnlichkeit mit einer Immunglobulin V-Domäne

C-Kreise : bedeuten, Ähnlichkeit mit einer Immunglobulin C-Domäne

S-S : Inter- und Intra-Disulphidbrücken

●— : Carbohydrat-Strukturen

1.5 Fragestellung

Die Produkte des MHC, die MHC-Antigene, sind wie unter Punkt 1.3 erläutert, die entscheidenden Erkennungsstrukturen für die zellulären Interaktionen und Erkennungsvorgänge im Immunsystem. Von vielen biologischen Molekülen ist bekannt, daß sie, um ihre Funktion ausführen zu können, über biologisch aktive Bereiche auf dem Protein verfügen müssen.
Ziel der vorliegenden Arbeit sollte es sein, zu klären, ob MHC-Antigene über solche biologischen Bereiche verfügen, die anderen Zellen des Immunsystems, insbesondere zytotoxischen T-Zellen als Erkennungsstrukturen dienen.

Daß es für Antikörper solche spezifischen Bereiche gibt, zeigen Untersuchungen am H-$2K^b$, bzw. an H-$2K^{bm}$-Mutantenmolekülen, die durch bestimmte Aminosäureaustausche definiert sind. Aus solchen Untersuchungen geht hervor, daß die antigenen Determinanten für die Antikörper nicht wahllos über das MHC-Antigen verteilt sind, sondern sich im wesentlichen auf 2-3 Bereiche konzentrieren (Hämmerling et al.,1982). Diese Bereiche wiederum liegen auf den ersten beiden Domänen, $\alpha 1$ und $\alpha 2$.
Es sollte daher zunächst verglichen werden, ob Antikörper und zytotoxische T-Zellen die gleichen oder verschiedene Bereiche auf dem MHC-Antigen erkennen.
Weiterhin sollte geprüft werden, wo genau auf den äußeren Domänen die Erkennungsstrukturen für zytotoxische T-Zellen lokalisiert sind.
Schließlich sollte untersucht werden, ob die Domänen auf dem MHC-Antigen sich gegenseitig durch Konformation beeinflussen und ob dies Einfluß auf die Funktion, d.h. auf die Erkennung der Zielzelle durch die zytotoxischen T-Zellen hat.

Für die Untersuchungen wurden zwei experimentell unterschiedliche Ansätze gewählt.

Erstens: die Methode, alloreaktive, restringierte oder klonierte zytototoxische T-Zellen mit monoklonalen Antikörpern durch Targetinhibition bei der Lyse der Zielzellen zu blockieren. Ein Vergleich der Inhibitionskurven sollte zeigen, ob monoklonale Antikörper und CTLs die gleichen, oder verschiedene Bereiche auf dem MHC-Antigen erkennen.

Zweitens: die Methode des Austausches von H-2 Domänen. Aus verschiedenen H-2 Allelen wurden Hybridgene erhalten (Arnold et al.,1984), und untersucht, welchen Einfluß der Austausch bestimmter äußerer Domänen auf dem MHC-Protein auf die Erkennung durch zytotoxische T-Zellen hat. Mit diesem Versuchsansatz sollte zugleich die genaue Lage der Erkennungsstrukturen für die CTLs auf dem MHC-Antigen bestimmt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Labormaterial

2.1.1 Chemikalien

L-Glutamin (200mM), Penicillium/Streptomycin (10.000 units/ml) , Trypsin (0.25%), geliefert von GIBCO, Karlsruhe, Deutschland; 2-Mercaptoäthanol, BSA, NaCl, DMSO, K_2HPO_4, KH_2HPO_4, HCL wurden bezogen von MERCK, Darmstadt, Deutschland; Pristan lieferte ROTH KG., Karlsruhe, Deutschaland; Traphanblau kam von SERVA, Heidelberg, Deut - schland; PBS-Pulver, RPMI-1640 Pulver, Hepes lieferten SEROMED, München, Deutschland; Ficoll, Protein-A, Sepharose CL-4B, Concanavalin A (ConA), kamen von PHARMACIA, Uppsala, Schweden; Protein A (Prot.A) stammte von SIGMA, Taufkirchen, Deutschland; Fluoreszein-Isothiozyanat Isomer (FITC) kam von BBL, Cockeysville, U.S.A.; ^{125}J-Natriumiodid und ^{35}S-Methionin lieferten AMERSHAM BUCHLER, Braunschweig, Deutschland; ^{51}Cr-Natriumchromat stammte von NEN CHEMICALS, Dreieich, Deutschland.

2.1.1.1 Zellpuffer

D'PBS (Dulbecco's Phosphat gepufferte Saline)
PBS (Phosphat gepufferte Saline)
Ammonsulfat-Lösung
Borsäurepuffer

2.1.1.2 Medien

RPMI-Kulturmedium: 10% FCS, 1% Pen/Strep (Endkonztr. 100 units/ml), 2Me (Endkztr. $2x10^{-5}$M),1% Glutamin (Endkonztr. 2mM)
RPMI-Präparationsmedium: 3% FCS, 1%Pen/Strep(100 units/ml) 0.5% L-Glutamin (1mM Endkztr.)
Einfriermedium: 70% DPBS, 20% FCS, 10% DMSO

2.1.1.3 Materialien

Sämtliches Plastikmaterial , wie Röhrchen,Plastikpetrischalen etc. wurde , wenn nicht anders vermerkt,von der Firma GREINER,Nürtingen, Deutschland bezogen.

2.2 Versuchstiere

2.2.1 Mäuse

2.2.1.1 Wildtyp- und Rekombinantenmäuse

Folgende Wildtyp - und Rekombinantenmäuse wurden verwendet:[1)]

Tabelle 1

Stamm	H-2 Region K	I-A	I-E	D	Haplotyp	Herkunft [2)]
C57Bl/6 (B6)	b	b	b	b	b	Olac
C57Bl/10 (B10)	b	b	b	b	b	Olac
C3H.SW	b	b	b	b	b	
Balb/c	d	d	d	d	d	Han
DBA/2	d	d	d	d	d	Bom
B10.D2	d	d	d	d	d	Bom
CBA/J	k	k	k	k	k	Jax
B10.BR	k	k	k	k	k	
B10.A(3R)	b	b	k	d	i3	
B10.A(5R)	b	b	k	d	i5	
B10.GD	d	d	b	b	g2	
A/J	k	k	k	d	a	
B10.A	k	k	d	d	a	
B10.A(4R)	k	k	b	b	h4	
B10.T(6R)	q	q	q	d	y2	

1) Alle aufgeführten Mausstämme werden am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg gezüchtet. Die Tiere wurden im Alter von 6-8 Wochen mit Ektromelie-Vaccine geimpft und frühestens nach 2-3 Wochen für Versuche verwendet.

2) Bom: Gl. Bomholtgard Ltd., Ry, Dänemark
Han: Zentrale Versuchstieranstalt Hannover, Deutschland
Jax: The Jackson Laboratory, Bar Harbour, Main, U.S.A.
Olac: Shaws Farm, Blackthorn, Bicester, Oxon, Großbrit.

2.2.1.2 Mutantenmäuse ($H\text{-}2K^{bm}$) *

Alle verwendeten Mutantenmäuse[1)] gehören der bm-Serie an, mit Aminosäuresubstitutionen im $H\text{-}2K^{b}$ Locus.

Tabelle 2

Stamm	Synonym+	Haplotyp	As-Austausch
B6.C-H-2^{bm1}	B6.C(Hz1)	ba	152 Glu → Ala 155 Arg → Tyr 156 Leu → Tyr
C57Bl/6-H-2^{bm3}	B6.M505	bd	77 Asp ? 89 Lys → Ala
C57BL/6-H-2^{bm6}		bg2	116 Tyr → Phe 121 Cys → Arg
B6.C-H-2^{bm4}	B6.C (Hz170)	bf	150 158 173
C57Bl/6-H-2^{bm5}		bg1	116 Tyr → Phe
B6.C-H-2^{bm11}		bk	77 Asp → ?

1) Alle $H\text{-}2K^{b}$ Mutantenmäuse werden in der Tierzucht am DKFZ gezüchtet. Die bm-Mutantenmäuse wurden ursprünglich von Dr. J. Klein, Tübingen und Dr. K. Melief, Amsterdam , erhalten.

\+ (siehe Klein 1978)
* (siehe Nairn et al., 1980a und Ploegh et al., 1981b)

2.2.2 Ratten

Spraque-Dawley Ratten wurden von Mus-Rattus (Brunnental , Deutschland) bezogen. Wistar-Ratten lieferte die zentrale Versuchtieranstalt Hannover, Deutschland.

2.3 Zellinien

2.3.1 Tumorlinien

Tabelle 3

Linie	H-2	Ursprung	
EL4	H-2^b	C57Bl/6	T-Zell-Leukämielinie (Old et al.,1965
L929	H-2^k	C3H/An	Fibrosarkom (Earle 1943)
P815	H-2^d	DBA/2	Mastozytom (Lundak und Raidt, 1974

Die Tumorlinien wurden in 20 ml Kulturmedium in 250 ml Plastikflaschen liegend inkubiert. Alle 2-3 Tage wurden die Zellen auf etwa $2x10^5$/ml verdünnt. L929 Zellen wurden zuvor abtrypsiniert (1:250, 0.25%ig, ohne Ca und Mg; Gibco.

2.3.2 H-2 transfizierte Maus-Fibroblastenlinien

Modifizierte H-2 Gene wurden durch Co-Transfektion mit einem geeigneten Selektionsgen in Maus-Fibroblastenzellen zur Expression gebracht (2.8.2). Als Fibroblastenlinie wurde die Maus-linie 1T 22-6 TK^- (H-2^q; aus Swiss 3T3 Mäusen isoliert) anstell der üblichen L-Zellen verwendet.
Die transfizierten Zellinien wurden mir freundlicherweise von Dr. B. Arnold und Dr. S. Kvist überlassen.

2.4 Seren

2.4.1 Fötales Kälberserum (FCS)

FCS wurde bezogen von den Firmen GIBCO-BIO-CULT, Glasgow, Schottland. Die FCS-Chargen wurden vor Gebrauch in MLC, CTL, Fusionen und Klonierungen auf optimale Brauchbarkeit hin überprüft.

2.4.2 Antiseren

Ratten anti-Maus Immunglobulinserum (RαMIg, 1mg/ml) bzw. Ziegen anti-Maus-Immunglobulinserum (GαMIg, 1mg/ml) wurde mir freundlicherweise von R. Wallich und Dr. G. Moldenhauer überlassen.

2.5 Monoklonale Antikörper

2.5.1 Gewinnung monoklonaler Antikörper aus Ascites

Anti H-2K^b Hybridomas wurden in entsprechende Rezipientenmäusen injeziert (i.p.) und wuchsen dort als Suspensionstumoren (Asciten) an. Um ein Anwachsen der Hybridoma-Zellen zu verbessern, wurde den Rezipientenmäusen 2 Tage vor der Injektion der Zellen 0.5 ml des Mineralöls Pristan i.p. verabreicht. Die gewonne Ascitesflüssigkeit wurde partiell durch Ammonsulfat-Fällung $(NH_4)_2SO_4$, gereinigt.

2.5.2 Ammonsulfat-Fällung

Die Ascitesflüssigkeiten Antikörper sezernierender Hybridomas wurden durch Ammonsulfat-Fällung partiell gereinigt. Gesättigte Ammonsulfat-Lösung, pH7, wurde zu gleichem Volumen Asci-

tesflüssigkeit bei RT unter ständigem Rühren langsam und tropfenweise zugegeben. Anschließend wurde das Präzipitat für 1 Stunde bei 4° C gerührt und dann bei 3000 rpm für 15 Min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde decantiert und das Pellet in PBS pH7, resuspendiert. Die Menge an PBS entsprach dem Ausgangsvolumen an eingesetztem Ascites. Der Fällungsvorgang wurde wiederholt, das Pellet anschließend in PBS aufgenommen und über Nacht bei 4°C gegen PBS dialysiert. Der Puffer wurde mindestens 2x gewechselt.

2.5.3 Monoklonale Antikörper

Folgende in Tabelle 4 aufgelisteten mAK +) wurden verwendet:

Tabelle 4

Hybridome	Immunisierung	Ig Klasse	Reaktion mit H-2 Antigenen	Korrelation mit Determinante	Epitop Region
K9-136	(C3HxA)F, anti-70.Z/3	γ3/κ	K^b private	H-2.33	A
K10-56	SJL anti-70.Z/3	γ2b/κ	K^b private	H-2.33	A
Y-25	BALB/c anti-B10.a(5R)	γ2b/κ	K^b, r, k, j	?	A
B8-24-3	BALB/c anti-EL4	γ1/κ	K^b (r)	?	A
H142-23	BALB/c anti-CBA	γ2b/κ	K^b, k, q, r, s	H-2.5	B
H142-45	BALB/c anti-CBA	μ/κ	K^b, k, q, r, s, f	?	B
Y-3	BALB/c anti-BALB.B	γ2b/κ	K^b, k, q, r, s	H-2.5	B
H141-11	BALB/c anti-B6	μ/κ	K^b, K^k, q, r, s, f, (D^b)	?	B
K7-65	A/J anti-70.Z/3	γ2a/κ	K^b private	H-2.33	C
K7-309	A/J anti-70.Z/3	γ2a/κ	K^b private	H-2.33	C
K9-178	(C3HxA)F$_1$ anti-70.Z/3	γ2a/κ	K^b private	H-2.33	C
5F.1	B10.D2 anti-EL4	γ2b/κ	K^b, f, k	?	C
28-13-3S	C3H anti-C3H.SW	μ/κ	K^b, f	?	C

+) Die monoklonalen Antikörper γ-3 und γ-25 wurden uns freundlicherweise von Dr.E.Lerner zur Verfügung gestellt, B8-24-3 stammte von Dr.G.Köhler, 5F.1 stamte von Dr.L.Sherman und der 28.-13-3S von Dr.D.Sachs.

2.5.4 Markierung von Antikörpern mit ^{125}Jod

100 µl einer Antikörperlösung (1mg/ml) z.B. RαMIg oder einer Protein A Lösung wurden mit 100 µl 0.5M Phosphat - puffer, pH 7.5 gemischt. Zu dieser Mischung wurden 1mCi = 10 µl Na^{125}Jodid (Amersham) hinzugefügt. Zum Start der Reaktion wurden 20 µl Chloramin T (Merck), das zuvor in 0.05M Phosphatpuffer pH7,5 (1-3mg/ml) frisch angesetzt worden war, hinzugefügt. (Greenwood et al., 1963). Das Gemisch wurde für 2 Min. bei RT inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 75 µl einer gesättigten Tyrosinlösung in 0.05 M Phosphatpuffer pH 7.5 und 100 µl KJ (1% in PBS gestoppt). Nach weiteren 2 Min. Inkubation bei RT wurden 650 µl PBS-BSA-NaN_3(1% Lsg.) hinzugefügt. Das gesammte Gemisch wurde über eine kleine Dowex-Säule (Dowex, Serva, Heidelberg) gegeben und die Säule mit 800 µl PBS-BSA-NaN_3 gewaschen. Um die Ausbeute an markiertem Antikörper zu bestimmen, wurde eine Probe mit Trichloressigsäure (20% TCA) gefällt. 50 µl der markierten AK-Lsg. wurden dazu mit 50 µl 20% TCA-Lsg. gemischt, in einer Eppendorfzentrifuge abzentrifugiert (1Min.,3000 rpm) und dann die Zahl der radioaktiven Counts im Überstand und im Präzipitat im Gamma-Zähler (Packard) bestimmt. 95% der Counts fanden sich danach im Präzipitat. Dies entspricht einer optimalen Markierung.

2.5.5 Der zellgebundene radioaktive Bindungstest (CRIA)

Im CRIA lät sich indirekt bestimmen, ob bzw. wieviel Antikörperaktivität in einer Ascitesflüssigkeit oder einem Überstand enthalten ist (Dies sagt aber noch nichts über den Titer, d.h. die Menge des Antikörpers / Volumeneinheit aus). Der Test wurde in 96ger Polyvenylchlorid-Platten (PVC-Platten, Cook, Alexandria, U.S.A.) durchgeführt, die zuvor mit PBS+0.1%NaN_3

in 2% BSA abgesättigt wurden. $1x10^6$/40µl/Loch EL4 Targetzellen wurden mit 40µl/Loch Überstand Ascitesflüssigkeit (Verdünnung 1:50 bis 1:100) für 30 Min. auf Eis inkubiert. Neben weiteren spezifischen Kontrollen wurden die Zellen nur in 40µl PBS-BSA-Azid inkubiert. Die Platten wurden nach der Inkubation für 1 Min. bei 1700 rpm abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen 3x mit PBS-BSA-Azid gewaschen. Anschließend wurde das Pellet mit 40µl/Loch ^{125}Jod-markiertem Protein A (1:100 in PBS/BSA verdünnt, mindestens 50.000 counts/Loch) erneut für 30 Min. inkubiert und anschließend 3x gewaschen. (Da IgM-Antikörper kein Protein A binden, muß evtl. Zwischenschritt mit RαMIg oder GαMIg eingeschoben werden.) Die Platten wurden mit einem heißen Widerstandsdraht geschnitten und die Menge an gebundenem radioaktivem Antikörper in den einzelnen Vertiefungen im Gammazähler (Packard-Instruments) bestimmt.

2.5.6 Markierung von Zellen mit FITC konjugierten Antikörpern

EL4 Zellen wurden mit anti H-2K^b Antikörpern inkubiert. Zur Analyse wurden die Zellen mit FITC konjugierten Ziege-anti- Maus Antikörpern (Sigma) markiert, und im Fluoreszenz-aktivierten -Zellsortierer (FACS; Bonner et al., 1972; Herzenberg et al.,1976; Lipinski und Herzenberg, 1980;) untersucht.

2.5.7 Immunpräzipitation

Zum Nachweis von Proteinen ist die Methode der Markierung mit ^{35}S-Methionin besonders geeignet. Die Methode ist eingehend beschrieben bei Dobberstein et al., 1979. Da es sich hierbei um eine metabolische Zellmarkierung handelt, wurden exponentiell wachsende Zellen, hier EL4 Tumorzellen, für 5-10 Minuten "puls" markiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem anionischen Detergenz (NP 40) lysiert. Das Lysat wurde vorabsorbiert mit Protein-A Sepharose, um unspezifische Bindungen zu beseitigen. Die eigentliche Immunpräzipitation erfolgte mit 20fach konzentrierten Kulturüberständen der entsprechenden Hybridome. Die Auftrennung der präzipitierten Proteine erfolgte auf 10-15% SDS Polyacrylamid Gelen (Blobel et al.,1975).
Anschließend wurden die Gele fixiert, getrocknet und die markierten Proteinbanden mit Hilfe der Fluographie-Methode (Bonner et al., 1974) sichtbar gemacht.

2.6 Präparation lymphoider Zellen

In den durchgeführten Experimenten wurden hauptsächlich die lymphoiden Zellen der Milz verwendet. Um Einzelzellsuspensionen herzustellen, wurden die Milzorgane sezerniert.

2.6.1 Milzzellen Präparation

Zu untersuchende Mäuse wurden getötet. Die Milzorgane wurden steril entnommen, zerkleinert und 2x in RPMI - Präparationsmedium gewaschen. Das Zellpellet wurde in RPMI-Kulturmedium resuspendiert, Zellzahl und Vitalität im Tryphanblau-Ausschlußtest bestimmt.

2.6.2 Präparation von Peritonealexudatzellen (PEC's)

Zur Gewinnung von PEC's als Fillerzellen wurde die Bauchhöhle getöter Mäuse steril mit 5-10 ml Präparationsmedium ausgespült. Die Zellen wurden mit einer Pateurpipette gesammelt, bei 2000 rpm abzentrifugiert, 5Min., 4°C und in Kulturmedium aufgenommen. Um jede Eigenreaktivität mit anderen Zellen auszuschließen, wurden die PEC's mit 3300 rad einer Caesium 173 Quelle (Gammacell, Canada) bestrahlt. Zellzahl und Vitalität wurden im Tryphanblau-Test ermittelt.

2.6.3 Ficoll-Trennung

Mit Hilfe der Ficoll-Trennung wurden lebende von toten Zellen getrennt. 5 x 10^7 Zellen wurden in 4 ml RPMI-Kulturmedium in silikonisierten Glasröhrchen vorsichtig mit demselben Volumen einer Ficoll-Lösung (φ = 1.077g/l, Pharmacia,Uppsala) unterschichtet und für 15 Min. bei 2000 rpm abzentrifugiert. Infolge der geringeren Dichte befinden sich die lebenden Zellen in der Interphase, während man die toten Zellen und Zellaggregate am Boden des Röhrchens wiederfindet. Die Zellen der Interphase wurden mit einer Pipette gesammelt, 3x in RPMI-1640 gewaschen und anschließend Zellzahl und Vitalität bestimmt.

2.7 Kultursysteme

2.7.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Alle Zellkulturen wurden im Brutschrank (Heraeus, Desaga, Heidelberg) bei 37°C, 7% CO_2 und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 80-90% gehalten.

2.7.2 Makrokulturen (Bulk Culture)

2.7.2.1 Die gemischte Lymphozyten-Kultur (MLC)

In einer primären MLC wurden 1 x 10^7 Responderzellen mit 1 x 10^7 bestrahlten (2200 rad) Stimulatorzellen stimuliert. Kultiviert wurden die Zellen in einem Gesamtvolumen von 7ml RPMI-1640 in kleinen Plastikfläschchen aufrecht stehend, für 5-6 Tage. Dies war die optimale Zeit, in der die Responderzellen eine maximale Anzahl von T-Blastzellen gebildet hatten, die gegen die entsprechenden H-2 Strukturen ge-

richtet waren. Am Tag 5-6 wurden die Zellen geerntet, bei 1500 rpm abzentrifugiert, das Pellet in RPMI-Kulturmedium resuspendiert und über Ficoll gereinigt.(In den Experimenten zeigte sich , daß der letztere Schritt nicht notwendig ist). Anschließend wurden die Zellen 3x gewaschen und die Zellzahl bzw. Vitalität bestimmt. Die CTLs wurden dann auf ^{51}Cr markierten Zielzellen getestet.

2.7.2.2 Herstellung von ConA Blasten

An stelle von Tumortargets wurden auch häufiger ConA Blasten als Zielzellen verwendet. Dazu wurden präparierte Milzzellen auf eine Zellkonzentration von $1x10^6$/ml in Kulturmedium eingestellt und mit 3 µg/ml ConA stimuliert. Die Zellen wurden in kleinen 50 ml Kulturfläschchen stehend für 48 Stunden inkubiert. Das Gesamtvolumen an RPMI-1640 betrug 7 ml Zellsuspension. Danach wurden die ConA aktivierten T-Zellblasten als Targets im ^{51}Cr-Freisetzungs-Test verwendet.

2.7.2.3 Markierung von Zellen mit ^{51}Cr

Tumorzellen, Maus-Fibroblastenlinien oder ConA Blasten wurden als Zielzellen (Targets) im ^{51}Cr-Test verwendet. Zu diesem Zweck wurden maximal 5 x 10^6 Zellen in einem 5 ml Plastikrörchen mit 150 - 200 ul ^{51}Cr-Natriumchromat (NEN Chemicals) bei 37°C, 10% CO_2 inkubiert. Tumorzellen wurden nach 1 1/2 Stunden, ConA Blasten und Fibroblastenzellen nach 2 Stunden Inkubationszeit 3x mit frischem Kulturmedium gewaschen. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt.

2.7.2.4 Der Zellvermittelte Massen-Zytotoxizitätstest (CML oder ^{51}Cr-Freisetzungs Test)

Der CML-Test (Brunner et al, 1976) wurde in 96ger Greiner Mikrotiterrundbodenplatten durchgeführt. 100 µl ^{51}Cr markierte Zielzellen wurden mit 100 µl Effektorzellen pro Mikrotiterloch für vier Stunden inkubiert. Während die Targetzellrate konstant blieb, 2 x 10^4/ml, wurde die Effektorzellrate variiert. Die Effektorzellen wurden austitriert von 1 x 10^6 Zelle/ml bis 7 x 10^4 Zellen/ml. Von jeder E:T Relation wurden Triplikate bestimmt. Vor dem Inkubieren wurden die Platten für 3 Min. bei 900 rpm anzentrifugiert, um die Zellen in engeren Kontakt zu bringen. Die Bestimmung der spontanen Lyse (low control)wurde ermittelt indem 100 µl ^{51}Cr markierte Targetzellen mit 100 µl Medium inkubiert wurden. Die maximale Lyse (hight control) wurde hingegen bestimmt, indem 100 µl ^{51}Cr markierte Zielzellen mit 100 µl 10% SDS inkubiert wurden. Vier Stunden später wurden die Platten abzentrifugiert und aus dem Gesamtvolumen von 200 ul/Mikrotiterloch jeweils 100 µl Überstand mit einer Multikal-Pipette in ^{51}Cr-release Röhrchen (Luckam, Sussex,England) übertragen. Der Prozentsatz an spezifischer Lyse der Targetzellen wurde gemessen (Triplikate), indem die Menge an freigesetztem Chrom im Überstand bestimmt wurde nach folgender Formel:

$$\% \text{ spez. Lyse} = \frac{\text{exp.}^{51}\text{Cr-Freisetzung} - \text{spontane Lyse}}{\text{max.}^{51}\text{Cr Freisetzung} - \text{spontane Lyse}} \times 100$$

2.7.2.5 Targetinhibition von CTLs aus Massenkulturen mit monoklonalen Antikörpern

Um zu klären, ob unterschiedliche Epitop-Regionen, die durch monoklonale Antikörper definiert werden, auch als Erkennungsstrukturen für zytotoxische T-Zellen (CTLs) dienen können, wurden entsprechende Targets - ConA Blasten, Tumorzellen oder Fibroblastenzellen - mit unterschiedlichen mAK vorinkubiert. Dazu wurden 2 x 10^3/50 µl Medium Targetzellen mit 50 µl Ascites (1:25, 1:100, 1:200, 1:500, 1: 1000, 1:5000, 1:10 000,bis 1:100 000) in 96ger Rundbodenplatten bei 4°C für 15 Min. vorinkubiert. Es wurden jeweils Triplikate angelegt. Anschließend wurden 100 µl Effektorzellen (CTLs) hinzugefügt. Das Effektor:Target Verhältnis betrug 50:1. Die Zellen wurden dann für 4 Stunden bei 37°C inkubiert und mit ihnen weiterverfahren wie unter 2.7.2.4 beschrieben.

2.7.3 Mikrokulturen

2.7.3.1 Gewinnung von T-Zell Wachstumsfaktor(en) aus Ratten ConA-Überstand

T-Zell Wachstumsfaktor(en), TCGF oder IL-2, wurde(n) aus Ratten ConA Überstand gewonnen.
Spraque-Dawley oder Wistar-Ratten wurden getötet, die Milzen steril entnommen, im Sieb zu Einzelzellsuspensionen verarbeitet und die Zellen in RPMI-Präp.medium gesammelt. Anschließend wurden die Zellen 3x gewaschen und auf 1 x 10^7/ml in RPMI-1640 Kulturmedium eingestellt. Je 70 ml Zellsuspension wurden in großen 500 ml Kulturflaschen (Falcon-3024) liegend für 24 Stunden inkubiert (37°C,10% CO_2). Die Zellen wurden mit 5 µg/ml ConA stimuliert. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert, der Ratten ConA-Überstand steril filtriert und in Aliquots bei -70°C aufbewahrt. Die Qualität des TCGF wurde im T-Zellproliferationstest bestimmt (Falk et al., 1983).

2.7.3.2 Grenzverdünnungsexperimente (Limiting Dilution)

Für die Grenzverdünnungsexperimente wurden 96ger (Greiner) Rundbodenplatten verwendet. Verschiedene Zellkonzentrationen - zwischen 0.25 bis 1 x 10^3 Zellen/Loch - aktivierter T Zellen einer fünf Tage alten MLC wurden zusammen mit 1 x 10^6/Vertiefung syngenen Fillerzellen (2200 rad bestrahlte Milzzellen oder 1 x 10^4/Vertiefung 3300 rad bestrahlte PEC's) in jeweils 24 Löchern ausverdünnt. Zusätzlich zu dem Zellgemisch wurden noch 1 x 10^6/Loch 2200 rad bestrahlte Stimulatorzellen in die Vertiefungen dazugegeben. Das Gesamtvolumen pro Mikrokultur betrug 200 µl. Die Zellen wurden in Medium expandiert, das 8-10% TCGF enthielt. Die Inkubationsdauer der Zellen lag zwischen 6-8 Tagen. Alle 2-3 Tage wurde mit einer Multikanal-Pipette die Hälfte des Mediums entfernt und durch 100 µl frisches Medium ersetzt. Gleichzeitig wurde das Wachstum der Zellen im Mikroskop beobachtet.

2.7.3.3 Limiting Dilution Zytotoxizitätstest

Für den Limiting Dilution Zytotoxizitätstest (Taswell et al., 1979) wurden Grenzverdünnungsexperimente angesetzt, wie unter 2.8.3.2 beschrieben. Nach 6-8 Tagen wurden unter sterilen Bedingungen 100 µl Zellsuspension aus jedem Loch entnommen und in eine neue Mikrititerplatte übertragen. Auf diese Weise wurden die Platten bzw. die Kulturen in den Platten geteilt. Während die ursprünglichen Mikrokulturen (noch 100 µl) weiter inkubiert wurden, wurde die Platte mit der anderen Hälfte der Zellen (100 µl) abzentrifugiert, das Zellpellet pro Vertiefung erneut in 100 µl frischem Medium resuspendiert und mit weiteren 100 µl ^{51}Cr markierten Zielzellen (1 x 10^6/ml) für vier Stunden

inkubiert und danach jede Mikrokultur im Gamma-Counter getestet, wieviel ^{51}Cr freigesetzt worden war. Nur solche Kulturen wurden als positiv erachtet, deren ^{51}Cr-Freisetzung höher war, als der Mittelwert der spontanen Freisetzung (low control) plus die doppelte Standardabweichung.

2.7.3.4 Bestimmung der CTL Vorläuferfrequenz

Um die Vorläuferfrequenz der CTLs zu bestimmen, wurde eine Analyse unter Verwendung einer linearen Regressionsgeraden durchgeführt (Taswell et al., 1979). Die zugehörige Formel lautet:

$$\ln y = - fx + \ln a$$

f = Frequenz der CTL Vorläufer
y = Prozentsatz negativer Kulturen
x = Anzahl der Responderzellen pro Kultur
a = Schnittpunkt mit der y-Achse, der 100% beträgt unter der Annahme einer Ein-Treffer Kinetik

Wird der Logarithmus des Anteils an negativen Kulturen gegen die Zellzahl pro Kultur aufgetragen, wird gemäß der Poisson Verteilung eine Gerade erwartet. Die CTL Vorläuferfrquenz ergibt sich aus der Anzahl der Responderzellen, die bei 37°C der Kulturen negativ sind. Man erhält eine Zellzahl, bei der statistisch eine Vorläuferzelle pro Kultur erwartet wird.

2.7.3.5 Expansion von CTLs

Für den weiteren Ablauf des Limiting Dilution Tests wurden nur solche Mikrokulturen gewählt, deren Zellen statistisch aus $\leq$ 1 Vorläuferzelle hervorgegangen waren. Zu diesem Zweck wurden von den ursprünglichen 100 µl Mikrokulturen, die weiter inkubiert worden waren diejenigen, die

aus $\leq$ 1 Vorläuferzelle hervorgegangen waren gepickt, in jeweils vier Mikrokulturen aufgeteilt, erneut mit syngenen, bestrahlten Fillerzellen , sowie mit bestrahlten Responderzellen, je 1 x 10^6/100 ul, stimuliert und mit TCGF expandiert. Nach 8-10 Tagen Inkubationszeit und Wechsel der Hälfte des Mediums alle 2 Tage, wurden die zugehörigen Mikrokulturen wieder gepoolt, in jeweils 5 ml Röhrchen bei 1500 rpm, 5 Min. abzentrifugiert, in Kulturmedium resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und die klonierten CTLs im ^{51}Cr-Freisetzungstest wie unter 2.7.2.4 beschrieben, analysiert.

2.7.3.6 Targetinhibition von CTLs aus Mikrokulturen mit monoklonalen Antikörpern

Bei der Targetinhibition von CTLs aus Mikrokulturen wurde ebenso verfahren wie im Falle der Targetinhibition von CTLs aus Massenkulturen (siehe 2.7.2.5).

2.8 Klonierung und Transfektion von H-2 Genen

2.8.1 Klonierte H-2K Gene

Das H-2K^d Gen wurde von Kvist et al., 1983 beschrieben. Es ist Teil eines 7.8 Kb Hind III Fragments, integriert und kloniert in der Hind III site des Plasmids pBR322.

Das H-2K^b Gen stammt von R.Flavell, ist ein 10.5 Kb EcoRI Fragment und inseriert in der EcoRI site von pBR322. (siehe Weiss et al., 1983)

Das H-2K^k Gen wurde mit mit Hilfe eines Sal I Linkers in die Sal I site von pBR322 integriert (Arnold et al., 1984 Manuskript in Präparation).

2.8.2 DNA-Transfektion und Expression in 1T 22-6 ($H\text{-}2^q$) Maus-Fibroblastenzellen

Die modifizierten H-2 Gene in den entsprechenden Plasmid-DNAs (3.8.1) wurden von Arnold et al.(1984) mit methodischen Modifikationen nach der Methode von Wigler et al., 1979,in 1T-22.6 Fibroblastenzellen mit einem geeigneten Selektionsgen (Southern und Berg, 1982) co-transfiziert. Im wesentlichen handelte es sich um Co-Transfektion mit DNA/Ca-Präzipitat und anschließendem Glycerolschock (Parker und Stark, 1979).
Untersucht wurden die transfizierten Zellen durch SDS-PAGE und Analyse im Fluoreszenz-aktivierten-Zellsorter (Arnold et al., 1984 , Manuskript in Präparation)

2.8.3 Konstruktion von $H\text{-}2K^d\text{-}K^k$ und $H\text{-}2K^b\text{-}K^k$ Hybridgenen

Die Methode, DNA-Sequenzen verschiedener H-2K Gene in Plasmide zu übertragen und damit $H\text{-}2K^d\text{-}K^k$ Hybridgene zu konstruieren ist bei Arnold et al., 1984 genau beschrieben. An dieser Stelle soll nur kurz das prinzipielle Vorgehen bzw. das Ergebnis für die Konstruktion eines bestimmten Hybridgens erläutert werden. Dies ist in Abb. 5a illustriert.
Nach Behandlung mit DNase und dem Restriktionsenzym ClaI wurde das Plasmid $pC31\text{-}K^d$ erhalten. Dies Plasmid trägt noch die ürsprüngliche K^d-Signalsequenz (S), sowie die Gensequenz für die $\alpha 1$ Domäne des $H\text{-}2K^d$ Moleküls. Das Plasmid $pC31\text{-}K^k$, das in ähnlicher Weise von Arnold und Mitarbeitern hergestellt wurde, trägt die gesamte K^k-Gensequenz, mit Ausnahme der $\alpha 1$ kodierenden Sequenz. Da die Gensequenzen in

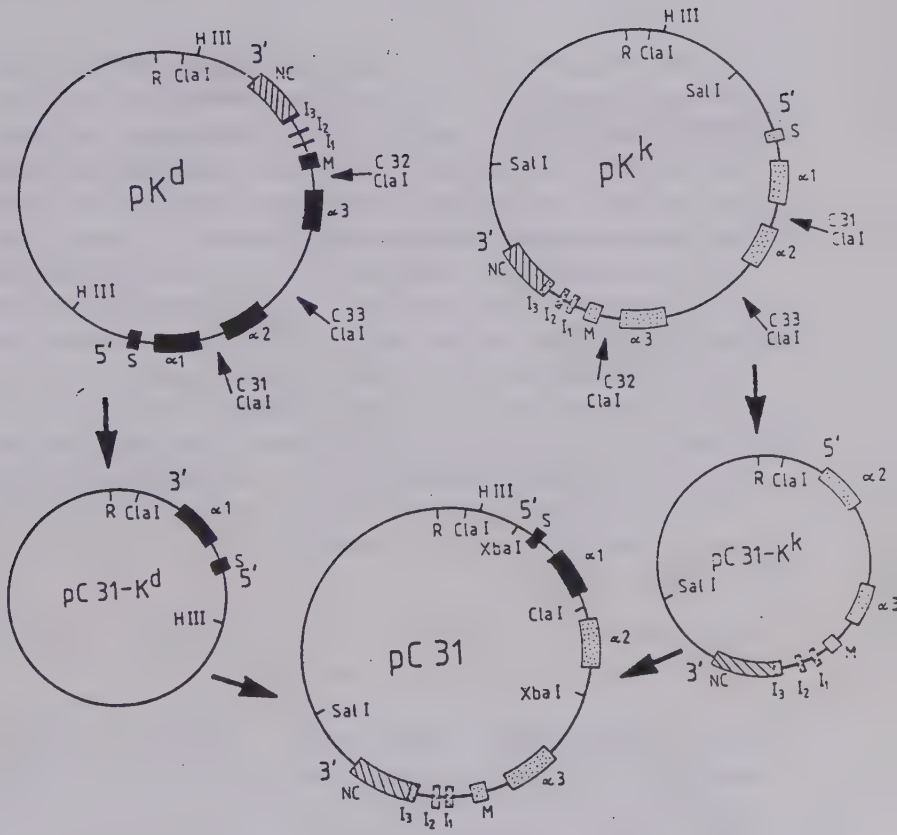


Abb. 5a Konstruktion eines H-2K^d-K^k Hybridgens

S: Signalsequenz; $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$: die drei äußeren extrazellulären Domänen; M: Exon, das für den Membranteil codiert; I_1, I_2, I_3: die zytoplasmatischen Exons; NC: 3'-nicht-kodierende Region; R: Eco RI; H III: Hind III; (nach Arnold et al., Cell 1984) Weitere Erklärungen , siehe im Text.

beiden Plasmiden jeweils in entgegengesetzter Richtung liegen, einmal vom 3'-5' für K^d und vom 5'-3' Ende für K^k, ist es möglich, durch direkte Verknüpfung der verschiedenen Genabschnitte an der ClaI Position ein Hybridgen zu erhalten, welches eine normale Exon/Intron Struktur aufweist: Nach der Signalsequenz (S;Exon 1) folgt, von nicht-kodierenden Introns unterbrochen, als nächste die $\alpha 1$ - Gensequenz, die vom H-$2K^d$ Allel stammt. Daran schließen sich die für die $\alpha 2$ und $\alpha 3$ Domänen kodierenden Exons 3 und 4 an, die vom H-$2K^k$ Allel stammen, sowie Exon 5, das für den Membranteil des Moleküls kodiert (TM), und die Exons 6, 7 und 8 für den zytoplasmatischen Teil des Moleküls (CP), sowie für die 3' nicht-translatierte Region (NC). Das in diesem Beispiel dargestellte H-2 Hybridmolekül wäre, bezogen auf die externen Domänen $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 3$ vom Typ H-$2K^dK^kK^k$.

In ähnlicher Weise, wie das pC31-$K^dK^kK^k$ Hybridgen, wurden auch die anderen Hybridgene hergestellt.

In Abb. 5b und Abb. 5c sind alle transfizierten Zellinien mit den transfizierten Genen, die sie exprimieren, aufgeführt.
Diese Linien wurden mir von Dr. B. Arnold und Dr. S. Kvist zur Verfügung gestellt.

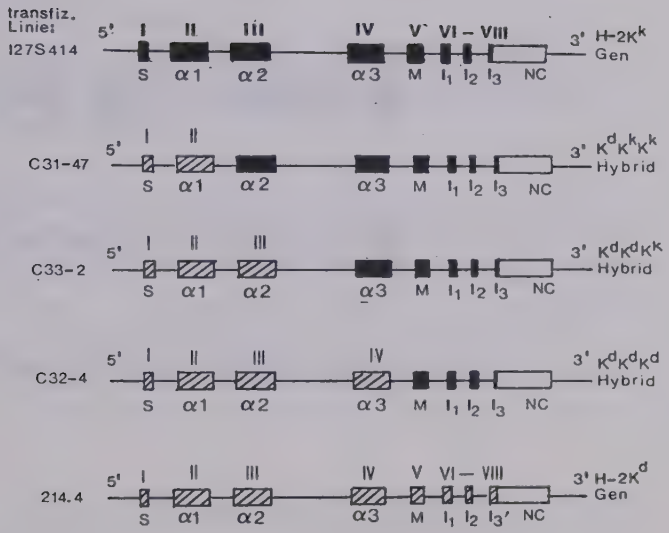


Abb. 5b Hybridgene aus zwei Allelen des K-Locus

Die Abbildung zeigt die Exon/Intron Struktur des H-2K^k und H-2K^d Gens, sowie die 3 Hybridgene aus diesen beiden Allelen. Für die Hybridgene ist jeweils die Herkunft der ausgetauschten Domänen $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 3$ angegeben. Weiterhin sind die transfizierten Zellinien genannt, die die entsprechenden Gene exprimieren. Unter den Exons I-VIII sind die Proteinbereiche angedeutet, für welche die Exons kodieren. S : Signalsequenz; $\alpha 1$ $\alpha 2$ $\alpha 3$: die äußeren Domänen; M : Membranteil; I1, I2,I3 : der zytoplasmatische Bereich; NC : 3'-nicht-kodierte Region; ▬ H-2K^k-Genabschnitt; ▨ H-2K^d Genabschnitt;
Die transfizierten Zellinien wurden mir von Dr. B. Arnold und Dr. S. Kvist zur Verfügung gestellt.

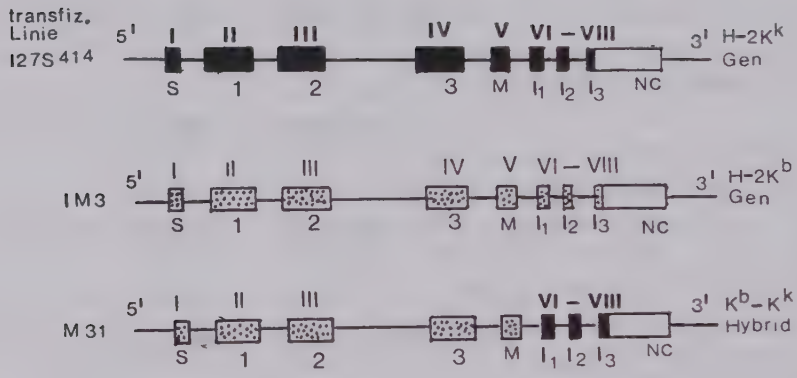


Abb. 5c Hybridgen aus zwei Allelen des K-Locus

Die Abbildung zeigt die Exon/Intron Struktur des H-2K^b und des H-2K^k Gens, sowie ein Hybridgen aus diesen beiden Allelen.In der Abb. ist sowohl die Struktur des transfi - zierten H-2 Gens angegeben, als auch die transfizierte Zellinie. Unter den Exons I-VIII sind die Proteinbereiche angedeutet, für die die Exons kodieren.
S : Signalsequenz; M : Membranteil; I1, I2, I3 : der zytoplasmatische Teil; NC : 3'-nicht-kodierte Region; $\alpha_1\alpha_2\alpha_3$: äußere Domänen ■ H-2K^k- Genabschnitt; ▨ H-2K^b-Genab - schnitt;

Die transfizierten Zellinien wurden mir von Dr. B. Arnold und Dr. S. Kvist zur Verfügung gestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der H-2K^b spez. monoklonalen Antikörper im CRIA, FACS und durch Immunpräzipitation

Die verfügbaren H-2K^b spez. mAK sollten in Targetinhibitionsexperimenten eingesetzt werden. Um Targetinhibitionskurven von verschiedenen Antikörpern miteinander vergleichen zu können, ist es notwendig, zuvor die Antikörperkonzentration in den einzelnen Asziten zu vergleichen. Zu diesem Zweck wurden die verschiedenen Asziten qualitativ und quantitativ im CRIA, FACS und durch Immunpräzipitation analysiert.

3.1.1 Titration der Ammonsulfat gefällten anti H-2K^b Antikörper im zellgebundenen, radioaktiven Bindungstest (CRIA)

Die Ammonsulfat gefällten Asciten wurden im CRIA getestet. Dazu wurden die Antikörper in einem Verhältnis von 1:50 bis 1:100 000 austitriert. Der Nachweis bzw. die Bindung der verschiedenen Antikörper in den Asciten erfolgte auf EL4 Tumorzellen. Die Zellen wurden dabei in mehreren Schritten markiert. Zunächst wurden EL4 Zellen zusammen mit den verschiedenen Asciten inkubiert, danach mit RαMIg und anschließend noch mit ^{125}Jod markiertem Protein A markiert. Als Kontrolle dienten ein humaner anti-idiotypischer Antikörper (HD 20, IgG, λ), sowie EL4 - Zellen in PBS-BSA-Azid.
Die Titrationskurven für die verschiedenen Antikörper sind in den Abbildungen 6a-6c dargestellt. Bei einer AK-Ver - dünnung von 1:100 liegen die cpm-Werte für fast alle Antikörper zwischen 15 000 und 24 000. Letztere Antikörperverdünnung wurde für die Experimente mit Limiting Dilution

Klonen eingesetzt. Eine Ausnahme bilden der K10-56, der H142-45 und der H141-11, deren cpm-Werte bei einer 1:50 Verdünnung über 24 000 cpm liegen. Für alle Antikörper zeigen die Bindungskurven einen deutlichen Titrationsverlauf. Insgesamt gesehen zeigen die Titrationskurven für alle Antikörper einen sehr ähnlichen Verlauf, was darauf schließen läßt, daß die Asziten vergleichbare Mengen an Antikörper enthalten, wenn man voraussetzt, daß die Affinität der Antikörper auch im wesentlichen ähnlich ist.

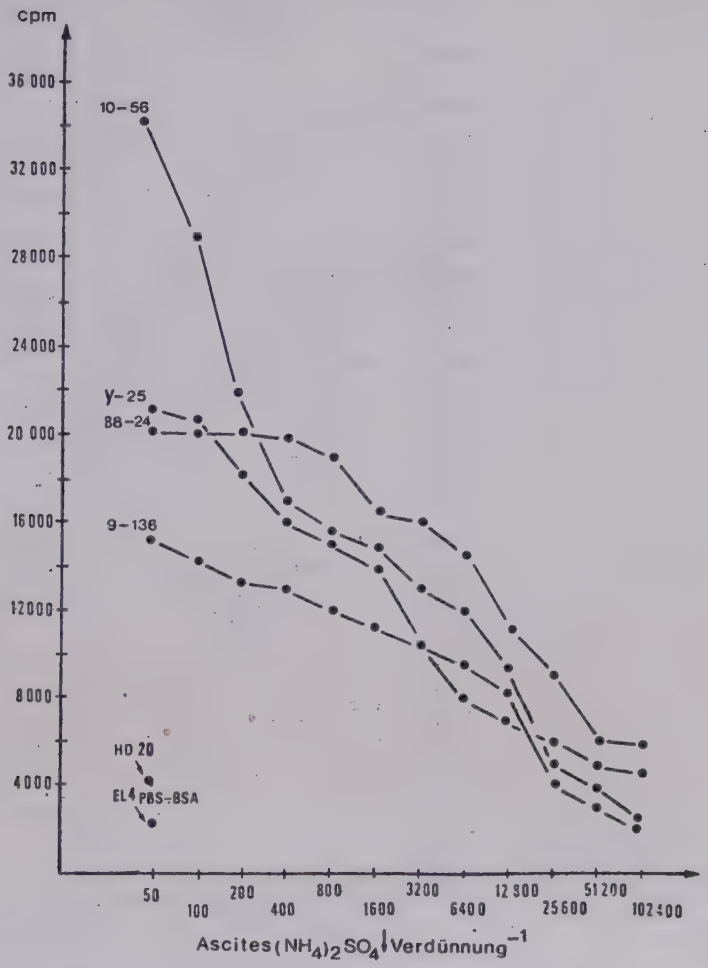


Abb. 6a Titrationskurven der H-2K^b spez. monokl. Antikörper K10-56, γ-25, B8-24-3 und K9-136 im CRIA;
Bindung auf EL4 Tumorzellen, 1x10^6 / 40µl;
Kontroll-AK*: HD-20 humaner anti-idiotyp.AK, IgG/λ ; Weitere Kontrolle: EL4 Tumorzellen in PBS-BSA-Azid; Markierung mit RαMIg (1mg/ml) und ^{125}Jod-Protein A.
* von Dr. G. Moldenhauer

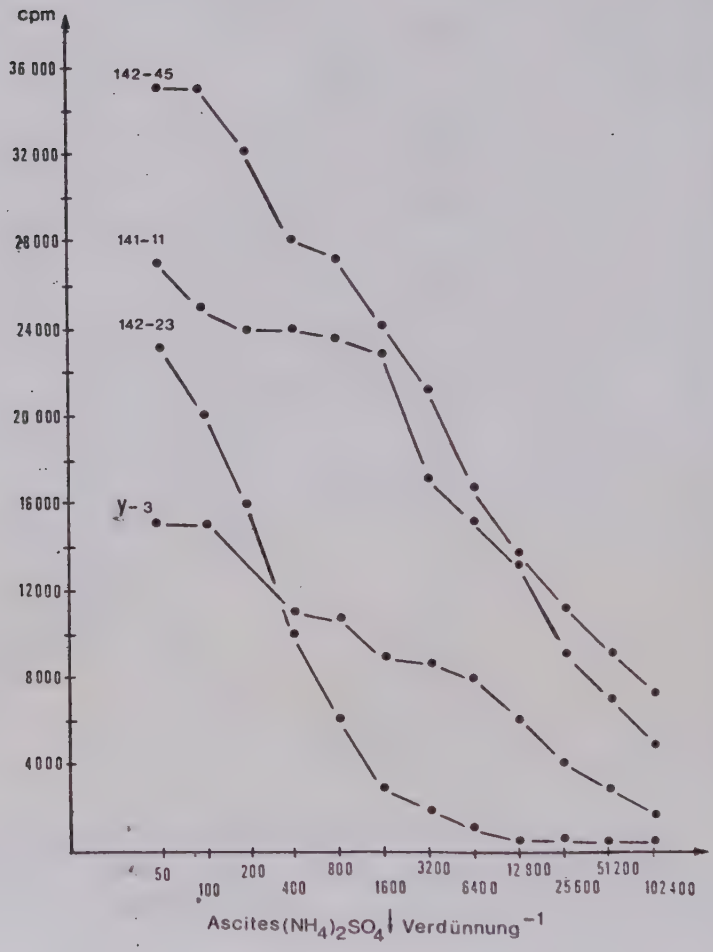


Abb. 6b Titrationskurven der H-$2K^b$ spez. monokl. Antikörper y-3, H141-11, H142-23 und 142-45 im CRIA.
Bindung auf EL4-Tumorzellen, $1x10^6$ / 40µl;
Markierung mit RαMIg (1mg/ml) und ^{125}Jod-Protein A;

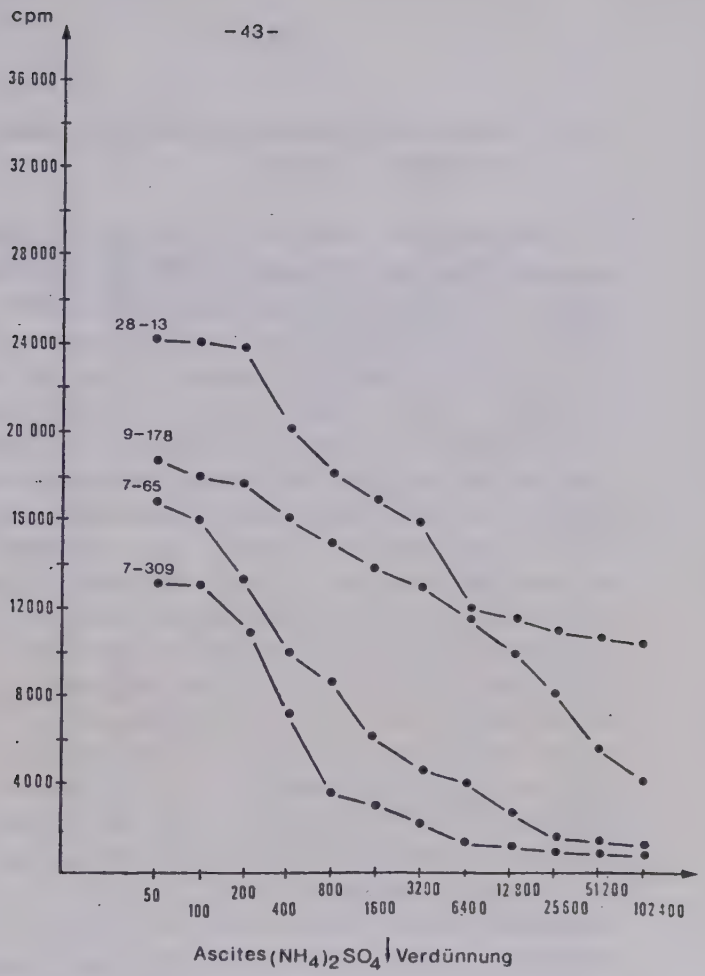


Abb. 6c Titrationskurven der H-$2K^b$ spez. monokl. Antikörper 28-13-3s, K9-178, K7-65 und K7-309;
Bindung auf EL4 Tumorzellen, $1x10^6$ / 40µl;
Markierung mit RαMIg (1mg/ml) und ^{125}Jod-Protein A;

3.2 Quantitative Bestimmung der gefällten anti H-2K^b Antikörper im FACS

In einem weiteren Schritt wurden die Ammonsulfat gefällten Antikörper im FACS analysiert. Zur Analyse wurden die Zellen mit Ziege anti-Maus konjugiertem FITC (1:100) markiert. Als Kontrolle diente der humane anti-idiotyp. AK HD 20 (IgG/λ), sowie EL4 Zellen , inkubiert mit FITC-AK. Abbildung 7 zeigt, daß bei einer AK-Verdünnung (Ascites) von 1:50 und 1:100 alle Zellen mit AK abgesättigt sind. In allen Aszites ist bei dieser Verdünnung die AK-Menge so groß, daß alle antigenen Determinanten auf dem H-2K^b Molekül (EL4) markiert werden. Mit steigender Verdünnung der Aszites zeigt sich allerdings dann, daß es einige Aszites gibt, bei denen die Antikörper schneller austitrieren, insbesondere der y-25, 142-23 und der 7-65.
Abbildung 8a-c zeigt das gleiche Experiment. Aufgetragen ist in diesem Fall die mittlere Fluoreszenz für die antigenen Determinanten auf dem K^b-Molekül. (Die Fluoreszenzintensität auf jeder einzelnen Zelle wird gemessen, gespeichert, und am Schluß die Intensität aller Zellen verglichen, gemittelt und als relative mittlere Fluoreszenz für jede Verdünnung pro Probe dargestellt)
Vergleicht man die Profile für die mittlere Fluoreszenzintensität mit den entsprechenden Titrationskurven im CRIA , so sieht man , daß der Verlauf der Kurven sehr ähnlich ist. Die Kontrolle, EL4 inkubiert mit FITC-Ak bzw. EL4-Zellen mit HD20 und FITC-AK inkubiert reagieren negativ. Sie zeigen keine bzw. nur geringfügige unspezifische Reaktion.
Die FACS Daten bestätigen, daß speziell bei einer Verdünnung von 1:50 bis 1:100 in allen Aszites vergleichbare Mengen an AK enthalten sind.

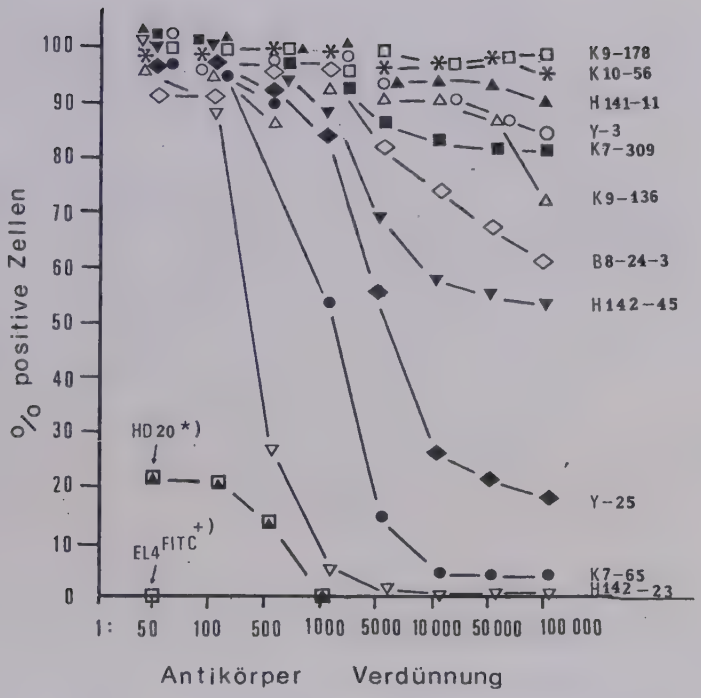


Abb. 7 Quantitative Bestimmung der Ammonsulfat gefällten Anti H-2K^b Antikörper aus Ascites im FACS

*) HD20: humaner anti-idiotyp. AK (IgG, λ) als neg. Kontrolle (erhalten v. Dr. G. Moldenhauer)

+) FITC-AK (1:100)

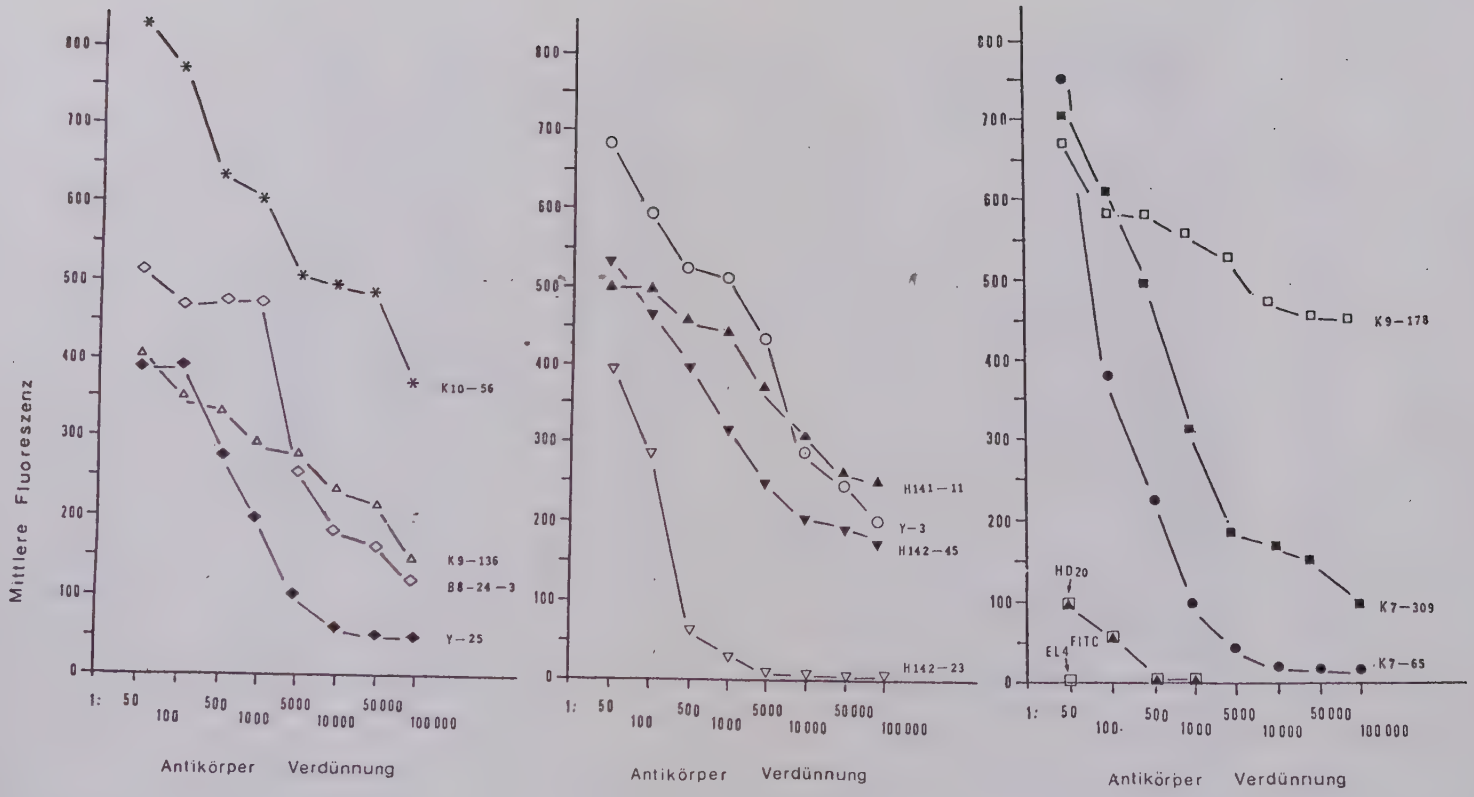


Abb. 8a-c Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensität im FACS, in Abhängigkeit von unterschiedlichen Ak - Konzentrationen. Kontrollen wie in Abb.7

3.3 Immunpräzipitation

^{35}S-Methionin markierte Protein-Lysate wurden mit 20fach konzentrierten Überständen entsprechender Hybridomas präzipitiert (Punkt 2.5.7), und das Präzipitat anschließend auf 10-15% SDS Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt.
Abb. 9 zeigt die spezifische Bande für das H-2K Molekül (44 Kb), nach Präzipitation des Zellysats durch die verschiedenen Antikörper. Als Vergleichssubstanz lief ein Gemisch aus verschiedenen Proteinen mit (Electrophoresis Calibration KIT, Pharmacia). Als Kontrolle wurde das 6.5-B5.2 Zellysat (IC9 Zellen, die mit dem H-2K^b Gen transfiziert wurden) mit einem Gemisch aus drei verschiedenen Antikörpern (7-309, 9-178 und 10-56) präzipitiert.
Es ist zu erkennen, daß der K10-56 (γ2b/k), der B8 (γ1/k) und der y-3 (γ2b/k) sehr stark präzipitieren. Der K7-309 (γ1/k) und K9-178 (γ2a/k) weisen mittelstarke Banden auf. K9-136 (γ3/k), y-25 (γ2b/k), K7-65 (γ2a/k) und der 142-23 (γ2b/k) präzipitieren nur schwach. Der H141-11 (μ/k) und der142-45(μ/k) immunpräzipitieren nicht , da sie kein Protein A binden. (Es wurde kein RαMIg verwendet) Obwohl daß Zellysat zuvor mit Protein A-Sepharose vorabsorbiert wurde , um unspezifische Bindungen zu beseitigen, zeigt sich noch eine unspezifische Bande bei 68Kb.

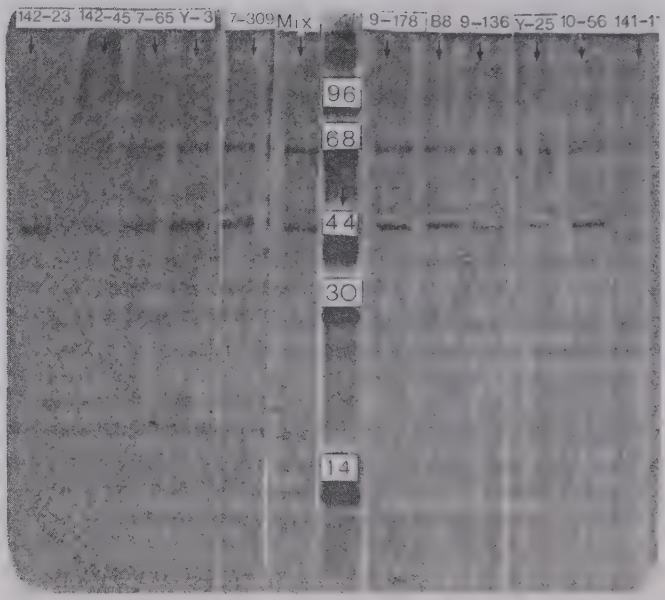


Abb. 9 Immunpräzipitation von H-2K^b Antikörpern und Auftrennung des Zellysats im SDS-Gel (PAGE)

Die spezifische Bande für H-2kAntigene liegt bei 44 000 Dalton. Die anderen Werte stehen für Markermoleküle. Unspezifische Bande bei 68 Kb.
Kontrolle: 6.5-B5.2 Zellysat (IC9 Zellen, transfiziert mit H-3K^b Gen) präzipitiert mit AK-Gemisch (Mix: aus 7-309,9-178,10-56)

3.4 Untersuchung auf unspezifische Inhibition von monoklonalen H-2K^b AK auf die Lyse von H-2^d Targets durch anti H-2^d spez. CTLs

In den folgenden Experimenten mit H-2K^b spezifischen alloreaktiven, restringierten und klonierten zytotoxischen T-Zellen (CTLs) soll durch Targetinhibition mit H-2K^b spez. monoklonalen Antikörpern verglichen werden, ob AK und CTLs gleiche oder verschiedene Bereiche auf dem H-2K^b MHC -Antigen erkennen.
Um darüber eine Aussage treffen zu können, muß vorher jedoch ausgeschlossen worden sein, daß die H-2K^b spez. monokl. AK nicht auch die Lyse anderer, nicht H-2K^b spez. CTLs blokkieren.
Um dies nachzuweisen, wurden 1x10^7 Responder-Milzzellen einer C57Bl/6 Maus (H-2^b) mit 1x10^7 bestrahlten Stimulatorzellen einer Balb/c Maus (H-2^d) für fünf Tage in kleinen Kulturfläschchen inkubiert. Anschließend wurde die Lyse von ^{51}Cr markierten P815 (H-2^d) Targetzellen bestimmt. Während die Zahl der Zielzellen konstant blieb, 1x10^4/ml, wurde die Zahl der Effektorzellen variiert, im Verhältnis Effektor:Target wie 50, 25, 12, 6, 3, 1.5, 0,75, und 0.37:1 und die Lysekurve aufgestellt (Abb. 10a).

Parallel dazu wurden die Targetzellen vor Zugabe der Effektorzellen (CTLs) mit den verschiedenen H-2K^b Antikörpern für 15 Minuten bei 4^{o}C vorinkubiert. Die Antikörperverdünnung (gefällte Asziten) betrug 1:50, 1:500 und 1:5000, das E:T Verhältnis 50:1. Wie die Abb. 10b zeigt, liegt die Lyse der Targets wie bei der Kontrolle bei 80%. Unterschiedliche Verdünnungen der verschieden H-2K^b Antikörper haben keinen unspezifischen Einfluß auf die

P815 Targetlyse durch H-2^d spezifische CTLs, d.h., sie blockieren die Effektorzellen nicht. In dem Experiment wurden jeweils Triplikat-Werte bestimmt.

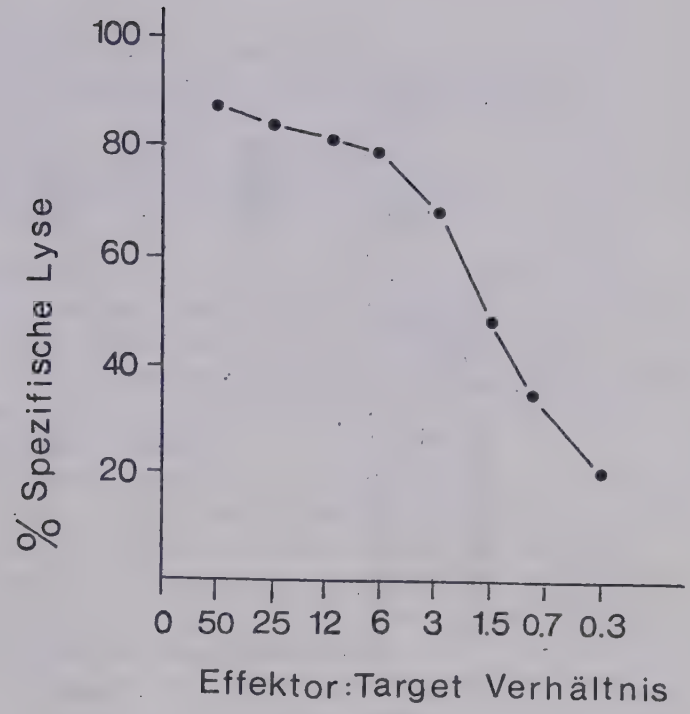


Abb. 10a Lysiskurve von C57Bl/6 anti Balb/c CTLs auf P815 Targetzellen ($H\text{-}2^d$).

Gemessen wurde % spez. Lyse (Triplikate) als ^{51}-Freisetzung:

$$\text{Spez. Freisetzung} = \frac{\text{exp. Frs.-spont.Frs.}}{\text{Max. Frs.-spont.Frs.}} \times 100$$

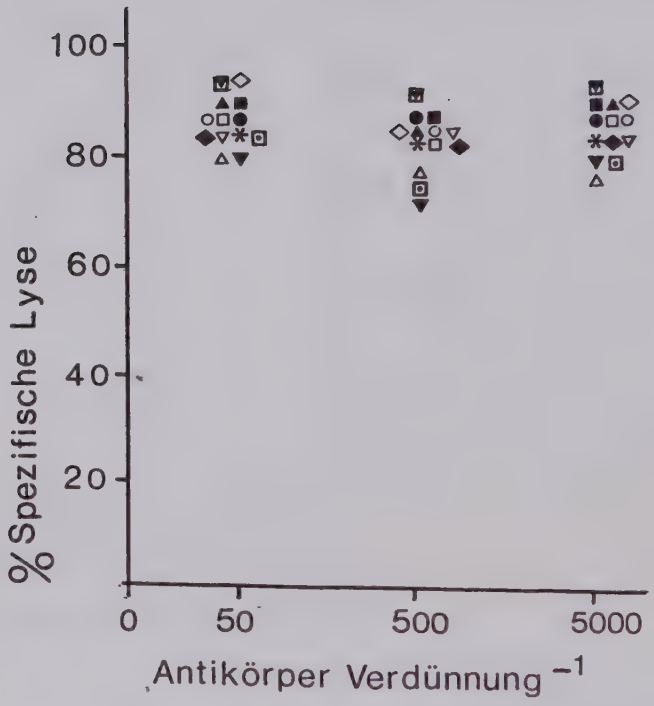


Abb. 10b Darstellung der Lyse von P815 (H-2^d) Zielzellen durch anti H-2^d CTLs nach Vorinkubation der Targets (15 Min., 4^oC) mit unterschiedlichen H-$2K^b$ Antikörperverdünnungen. E:T Verhältnis 50:1; Verwendete monokl. Antikörper aus Ascites:

◇ 88-24-3 ▲ H141-11 □ K9-178
◆ Y-25 ▽ H142-23 ■ K7-309
△ K9-136 ○ Y-3 ● K7-65
✱ K10-56 ▼ H142-45
⊡ X-63
⊡ Mix

3.5 Vergleichende Analysen von Erkennungsregionen für mAK und CTLs durch Targetinhibitionsexperimente

3.5.1 Erkennungsregionen von H-2 K^b Antikörpern auf definierten Epitop-Regionen des H-2K^b Moleküls

Die folgenden Experimente sollte Aufschluß darüber geben, ob Antikörper und zytotoxische T-Zellen gleiche, oder verschiedene Erkennungsbereiche auf H-2 Molekülen sehen. Grundlage dieser Experimente sind Ergebnisse, die aus früheren Untersuchungen an H-2 Molekülen mit monoklonalen Antikörpern gewonnen wurden.

Aus solchen Untersuchungen an H-2 Molekülen ist bekannt, daß die Antigenen Determinanten für Antikörpermoleküle nicht zufällig über das Molekül verteilt liegen, sondern sich hauptsächlich auf zwei bis drei Epitop-Regionen auf den ersten beiden äußeren Domänen des H-2 Moleküls konzentrieren. Dies wurde sowohl für das H-2K^k (Weyand et al.,1981), für das H-2D^b (Lemke et al., 1982), als auch für das H-2K^b Molekül (Hämmerling et al.,1982)gefunden. Diese Resultate beruhen auf Blockierungsexperimenten, die mit einem Satz von monoklonalen Antikörpern durchgeführt wurden, wobei die Bindungsfähigkeit eines mit Jod markierten Antikörpers bei gleichzeitiger Zugabe eines zweiten, unmarkierten Antikörpers bestimmt würde. Aus solchen Untersuchungen ging beispielsweise für das H-2K^b Molekül hervor, daß die Antikörper in drei Hauptgruppen fallen, die willkürlich als A, B,C bezeichnet wurden (Abb.11).

Während sich die Antikörper innerhalb einer Gruppe blockieren, ist dies nur geringfügig oder garnicht der Fall für Antikörper verschiedener Gruppen, z.B. A und C. Aus solchen Experimenten wurde für das H-2K^b Molekül geschlossen, daß die Determinanten für die Antikörper auf bestimmte Regionen konzentriert sind.

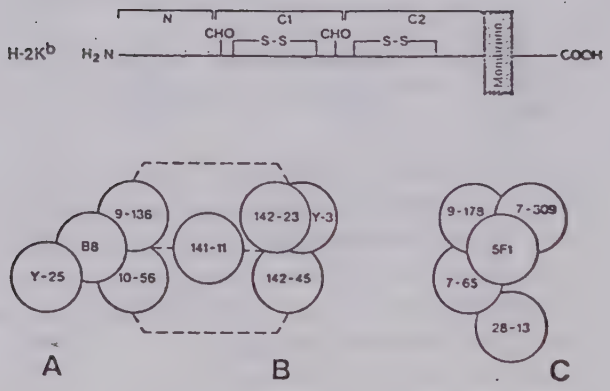


Abb. 11 Schematische Darstellung von Allodeterminanten auf dem H-2K^b Molekül, darüber ein Diagramm des H-2K^b Moleküls.

Die gestrichelten Linien sollen andeuten, daß diese antigenen Regionen benachbart sind. Die genaue Position der Determinanten für die AK-Gruppe B in Relation zu A und C ist nicht bekannt.
CHO = Carbohydrate; S-S = Disulfidbrücke; N = N-Terminus; C1, C2 = zweite und dritte externe Domäne; COOH = C-Terminus;
(verändert nach Hämmerling et al.,1982)

Diese Experimente wurden auch, wie unter Punkt 3.6 erläutert werden wird, mit H-2K^b Mutanten-Mäusen (bm-Mutanten) durchgeführt. Die H-2K^b Antigene dieser Mäuse sind durch bestimmte As-Substitutionen , deren Position auf dem Molekül bekannt ist (Tab. 2, Abb.15),charakterisiert. Experimente mit Mutanten-Mäusen gestatten nicht nur , einen Vergleich zu ziehen, ob AK und CTLs gleiche oder verschiedene Bereiche erkennen, sondern auch genauer analysieren zu können, wo auf den beiden äußeren Domänen die Erkennungs - bereiche für die monoklonalen Antikörper und zytotoxischen T-Zellen liegen könnten.

3.5.2 Erkennungsregionen für alloreaktive CTLs

Aus den Untersuchungen am H-2K^b Wildtypmolekül ging hervor, daß die antigenen Determinanten für Antikörpermoleküle auf bestimmte Bereiche des Moleküls beschränkt sind, die als A, B und C bezeichnet wurden.
Stellen solche Bereiche möglicherweise auch Erkennungsbereiche für zytotoxische T-Zellen dar? Mit anderen Worten, ist es vielleicht möglich, zytotoxische T-Zellen, die gegen das Wildtypmolekül gerichtet sind, mit H-2K^b spezifischen monoklonalen Antikörpern zu blockieren und an der Target - lyse zu hindern und wenn ja, geschieht dies präferentiell durch Antikörper einer bestimmten Gruppe.

Um dies zu untersuchen, wurden in vitro gegen B10.A(3R) Milzzellen (K^b/D^d) anti H-2K^b spezifische, alloreaktive CTLs induziert. Nach fünf Tagen wurden die Effektorzellen geerntet und im ^{51}Cr-Test auf EL4 (H-2^b) getestet. Als Kontrolle dienten ConA stimulierte B10.GD Blasten (K^d/D^b).
Wie Abb. 12 zeigt, liegt die Lyse der EL4 Targets bei 60% (E:T / 50:1), während die gleichen CTLs das Kontrolltarget (B10.GD) nicht lysieren.
In einem Parallelansatz wurden die EL4 Zielzellen zunächst mit unterschiedlichen Verdünnungen an H-2K^b spezifischen Antikörpern vorinkubiert, bevor die alloreaktiven CTLs zu den Targetzellen hinzugegeben wurden (E:T / 50:1).
Getestet wurden dreizehn verschiedene K^b-Antikörper, sowie eine Mischung (Mix) aus allen Antikörpern. Als nicht spezifischer Kontrollantikörper wurde Ascites von X63 (B-Zell Myelom aus MOPC21) eingesetzt. Für den Versuch wurden Triplikat-Werte bestimmt.

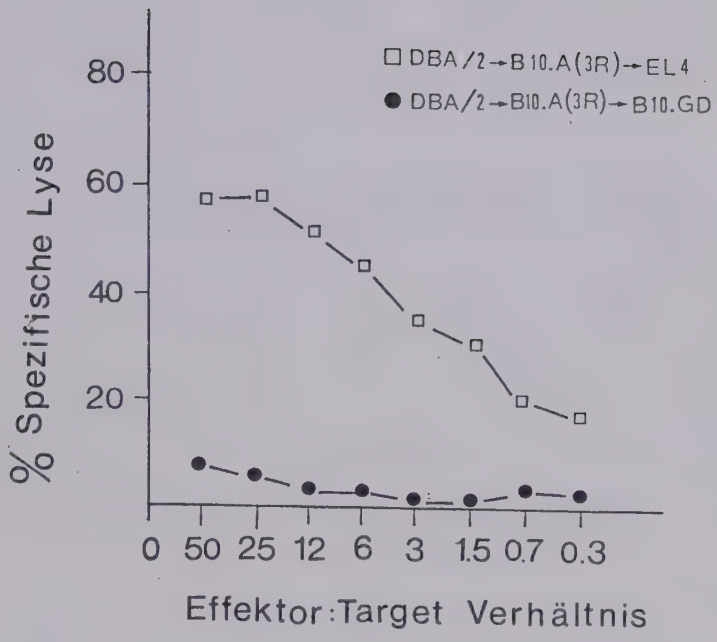


Abb. 12 Lyse von EL4 (□) Tumortargets ($H\text{-}2^b$) und B10.GD (●) ConA Blasten (d/b) durch alloreaktive anti $H\text{-}2K^b$ DBA/2 anti B10.A(3R) CTLs.

$$\% \text{ spez. Lyse} = \frac{\text{Exp. } {}^{51}\text{Cr-Frs.-spont.Frs}}{\text{Max. } {}^{51}\text{Cr-Frs.-spont.Frs}} \times 100$$

(Triplikate)

In den Abbildungen 13a-c sind die Ergebnisse der Targetinhibition dargestellt. Abb. 13a zeigt die Inhibitionskurven, die von solchen Antikörpern verursacht werden, die auf dem K^b-Wildtypmolekül die Region A (Cluster) repräsentieren. Es zeigt sich, daß es drei Muster der Antikörperinhibition gibt. Es gibt erstens Antikörper, die nicht inhibieren. Zu ihnen gehören in Abb. 13a der KontrollantikörperX63, der , wie erwartet, nicht inhibieren sollte, sowie die Antikörper y-25 (γ2b) und K9-136 (γ3). Diese beiden Antikörper haben keinerlei inhibitorischen Einfluß auf die Targetlyse, die, bei einem E:T Verhältnis von 50:1, bei 60% liegt. Dies Ergebnis stimmt mit der Kontrolle in Abb.13a überein. Des weiteren gibt es Antikörper, die mittelstark inhibieren. In Abb.13a ist dies der K10-56 (γ2b). Bei einer Antikörperverdünnung von 1:200 findet sich aber bereits keine inhibitorische Wirkung mehr. Schließlich, drittens, gibt es noch eine dritte Gruppe von Antikörpern, die sehr stark inhibieren. Dazu gehört in Abb. 13a der B8-24-3 und die Mischung (Mix) aus allen dreizehn Antikörpern.
Auch aus den folgenden Inhibitionskurven, wie sie durch die anderen AK verursacht werden, gewinnt man den Eindruck, daß es auch dort nicht-inhibierende , mittelstark und stark inhibierende Antikörper gibt. Abb. 13b gibt die Inhibitionskurven der Antikörper wieder, die nach den erwähnten Untersuchungen die Gruppe B auf dem H-$2K^b$ Molekül repräsentieren.
Keinen oder nur sehr schwachen inhibitorischen Einfluß zeigen der H141-11 (μ) und der H142-23 (γ2b). Beim y-3 (γ2b) findet sich nach einer Verdünnung von 1:200 keine hemmende Wirkung mehr. Stark inhibierend ist dagegen der H142-45 (μ).

Abb. 13c schließlich zeigt die Antikörper, welche Region C charakterisieren. Keine hemmende Wirkung kommt dort dem 28-13-3s (μ) und dem 5F.1 (γ2b) zu.Mittelstarke Inhibition wird durch K7-65 (γ2a) und vom K9-178 (γ2a) bewirkt, während der K7-309 (γ2a) sehr stark die EL4 Lyse verhindert.

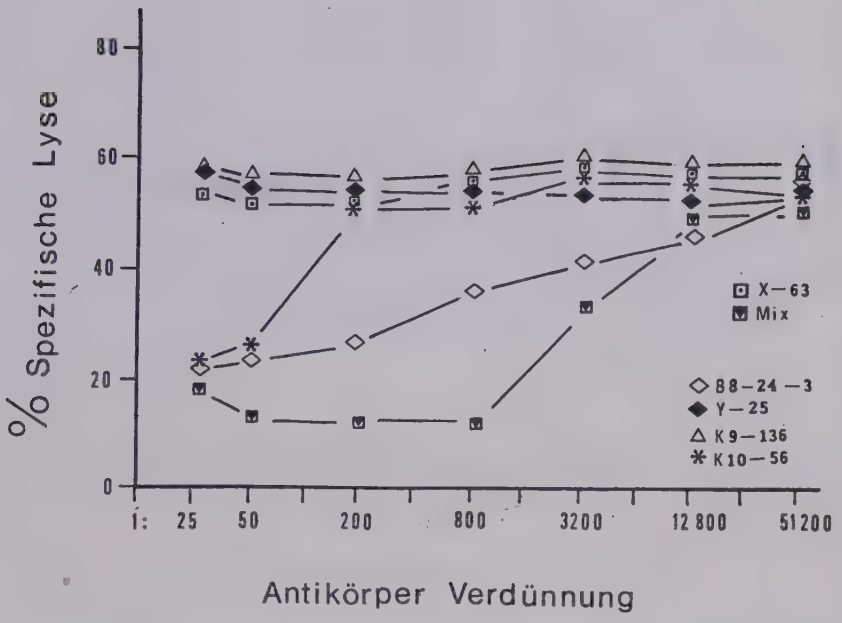


Abb. 13a - Lyse von EL4 Tumortargets(H-2^b) durch anti-H-$2K^b$ CTLs [DBA/2 anti B10.A(3R)] und Targetinhibition mit monokl. H-$2K^b$ Antikörpern

⊡ X63 : AK aus Ascites der Myelomlinie MOPC21 γ_1/ κ ; diente als neg.Kontr.

⊡ Mix : Mischung aus allen in Abb. 13a-c gezeigten Antikörpern; E:T/50:1;

Abb. 13a zeigt Inhibitionskurven, die verursacht werden durch solche AK, die nach Hämmerling et al., 1982 den AK-Bereich A auf dem H-$2K^b$ Wildtypmolekül definieren.

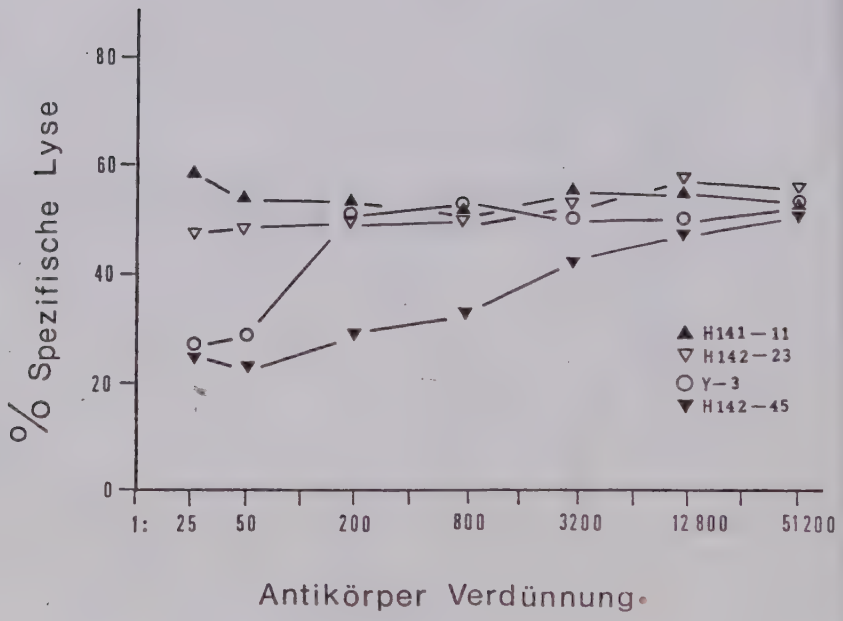


Abb. 13b Lyse von EL4 Tumortargets (H-2^b) durch anti-H-$2K^b$ CTLs [DBA/2 anti B10.A(3R)] und Targetinhibition mit monokl. H-$2K^b$ Antikörpern

Abb. 13b zeigt Inhibitionskurven, die verursacht werden durch solche AK, die nach Hämmerling et al., 1982 den AK-Bereich B auf dem H-$2K^b$ Wildtypmolekül definieren.

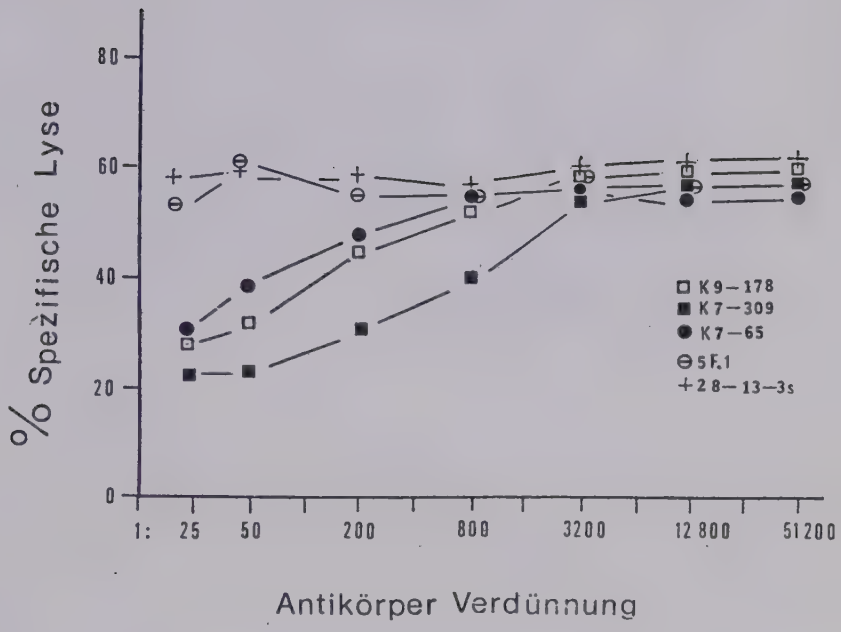


Abb. 13c Lyse von E14 Tumortargets (H-2^b) durch anti-H-$2K^b$ CTLs [DBA/2 anti B10.A(3R)] und Target-inhibition mit monokl. H-$2K^b$ Antikörpern

Abb. 13c zeigt Inhibitionskurven, die verursacht werden durch solche AK, die nach Hämmerling et al. 1982 den AK-Bereich C auf dem H-$2K^b$ Wildtypmolekül definieren.

Aus den Experimenten wird deutlich, daß es es offenbar keine von den drei Antikörpergruppen gibt, die präferentiell die CTL-Targetlyse inhibiert . Dies steht in Widerspruch zu früheren Experimenten, die für das H-$2K^k$ Molekül durchgeführt wurden (Weyand et al.,1981). Dieser Punkt wird später noch diskutiert werden(Punkt 4.2). Für das H-$2K^b$ Molekül ist es vielmehr so, daß aus jeder Antikörper-Gruppe Antikörper in der Lage sind, die Targetlyse zu inhibieren, während es ebenso aus jeder Gruppe Antikörper gibt, die keinen inhibitorischen Einfluß auf die alloreaktiven zytotoxischen T-Zellen haben.

3.5.3 Erkennungsbereiche für anti H-2K^b (Minor) restringierte zytotoxische T-Zellen

Der folgende Versuch sollte Aufschluß darüber geben, ob CTLS im restringierten System, in diesem Fall gegen Minor Antigen(e), sich nach Targetinhibition mit monoklonalen Antikörpern anders inhibieren lassen, als alloreaktive CTLs. Man kann spekulieren, ob es für restringierte CTLs nicht andere Erkennungsbereiche, als für alloreaktive CTLs gibt. Dies könnte sich für CTLs in verschiedenen Systemen in unterschiedlichen Inhibitionsmustern ausdrücken, was man als Beweis für das Vorkommen spezifischer Erkennungsbereiche für CTLs auffassen kann.
Im vorliegenden Experiment wurden C3H.SW (♀) Mäuse (H-2^b) in vivo mit unbehandelten C57Bl/6 (♀) Milzzellen (H-2^b) vorimmunisiert. Pro Maus wurden 4-5x10^7 Zellen in 500 µl PBS-Lsg. in die Bauchhöhle (i.p.) injiziert. Zwischen Tag 10 und Tag 23 nach Vorimmunisierung wurden den C3H.SW Mäusen die Milzen entnommen und die Zellen in vitro erneut mit bestrahlten Milzzellen stimuliert. 15x10^6 Responderzellen wurden mit 15x10^6 Stimulatorzellen für fünf Tage inkubiert. Danach wurden die Zellen geerntet und im ^{51}Cr-Test auf den entsprechenden ConA Blasten bzw. Tumortargets getestet.
Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 14a und 14b dargestellt.

Abb. 14a zeigt die Lysekurve von CTLs, die aus C57Bl/6 Mäusen stammen, die zunächst 16 Tage vorimmunisiert wurden. Zytotoxische T-Zellen, die weniger als 14 Tage lang vorimmunisiert worden waren, zeigten auch nach Restimmulierung in vitro nur schlechte bis keine Killaktivität im ^{51}Cr-Test. Dasselbe Ergebnis ergab sich für Zellen, die 22-23 Tage nach Vorimmunisierung und erneuter Stimulierung in vitro getestet wurden. Sie hatten offensichtlich ihre lytische Aktivität verloren. Beste Lyseaktivität erzielte man mit Zellen, die für 15-19 Tage vorbehandelt worden waren. Wie in Abb. 14a dargestellt, liegt die Killaktivität von 16 Tage lang in vivo vorimmunisierten und in vitro restimmulierten CTLs bei rund 70% spezifischer Lyse. Das Kontroll-Target wird nur unwesentlich lysiert.
Gleichzeitig wurden die H-2K^b restringierten, Minor spezifischen CTLs auf ihre lytische Aktivität nach Targetinhibition mit H-2K^b spezifischen Antikörpern getestet. Das Ergebnis, in Abb. 12b dargestellt, bestätigte nicht die oben angestellte Hypothese. Die restringierten CTLs zeigen kein neues, für restringierte CTLs spezifisches Inhibitionsmuster. Vielmehr ist es so, daß die Inhibitionskurven sehr stark denen gleichen, wie sie schon aus den Versuchen im Allosystem bekannt sind.
Ebenso wie im Allosystem üben die Antikörper K9-136,y-25, H142-23, 141-11 und 28-13-3s keine Hemmung auf die Targetlyse aus. Die Antikörper K9-178, y-3 und K10-56, besonders letzterer, zeigen zwar bei einer 1:50 Verdünnung mittel - starke inhibitorische Wirkung. Bei einer Antikörperverdünnung von 1:200 ist der hemmende Effekt aber bereits aufgehoben. Ebenfalls wie im Allosystem wirken die Antikörper H142-45 und K7-65 mittelstark inhibierend, während der B8-24-3, der K7-309 und die Mischung aller Antikörper (Mix) die Targetlyse stark blockieren. Der Kontroll-Antikörper X63 (Aszites von MOPC 21, B-Zell Myelom) zeigt dagegen keinen Einfluß auf die Targetlyse durch die restringierten CTLs.

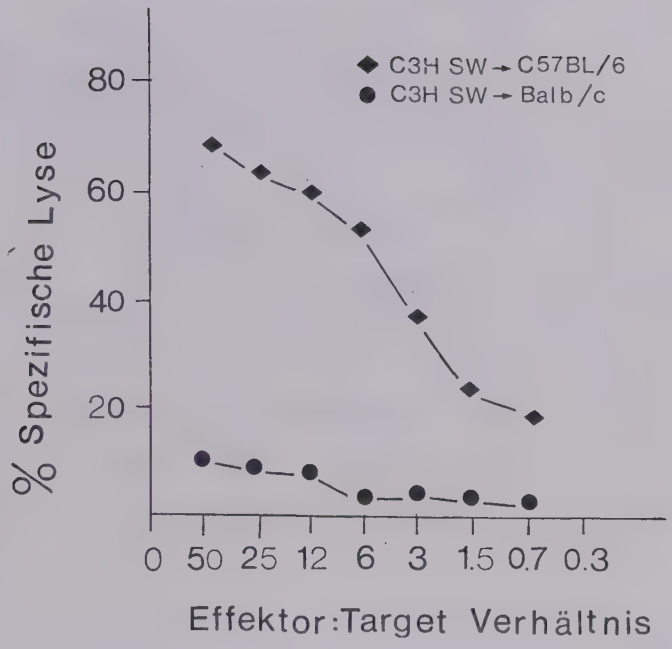


Abb. 14a Lyse von C57Bl/6 ♀ (◆ H-2^b) und Balb/c ♀ (● H-2^d) ConA stimulierten Blasten durch anti H-2^b (Minor) restringierte (C57BL/6 anti C3H.SW) spez. CTLs.

$$\% \text{ spez.Lyse} = \frac{\text{Exp. } {}^{51}\text{Cr-Frs.-spont.Frs.}}{\text{Max. } {}^{51}\text{Cr-Frs.-spont.Frs.}} \times 100$$

(Triplikate)

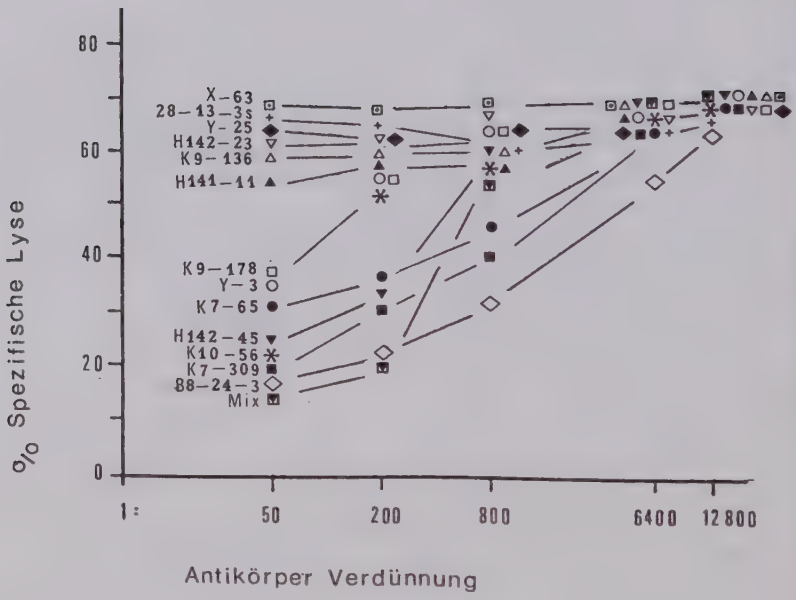


Abb. 14b Lyse von EL4 Tumortargets (H-2^b) durch anti H-2^b (Minor) restringierte (C57Bl/6 anti C3H.SW) spez. CTLs.

X63 : Kontroll-Antikörper aus MOPC 21

Mix : zusammengesetzt aus allen Antikörpern

E:T/50:1

3.6 Analyse von H-2K^{bm} - Mutanten

3.6.1 Lokalisierung von H-2K^{b} AK-Determinanten auf dem H-2K^{b} Molekül

Infolge der Schwierigkeit, sowohl im Allosystem, als auch im restringierten System mit den bisherigen Experimenten bestimmen zu können, welche Bereiche präferentiell auf dem H-2K^{b} Molekül von CTLs erkannt werden, versuchten wir das Problem auf andere Weise zu lösen.
Wie unter Punkt 3.5 erläutert wurde, ging aus Blockierungsexperimenten am H-2K^{k}, am H-2D^{b} (Lemke und Hämmerling, 1982) und am H-2K^{b} Molekül (Hämmerling et al.,1982) hervor, daß die von Antikörpern erkannten Allodeterminanten auf den Proteinen in 2-3 räumlich voneinander getrennten Bereichen konzentriert sind. Bislang war jedoch nicht klar, wo auf den äußeren Domänen $\alpha 1$ und $\alpha 2$ beispielsweise des H-2K^{b} Moleküls diese AK-Determinanten lokalisiert sind. Dies zu bestimmen ermöglichen Experimente mit Zellen von H-2K^{b} Mutanten - Mäusen.
Untersuchungen von Nairn et al.,1980a und Nathenson et al., 1981 haben gezeigt, daß es eine Reihe von Mutantenmäusen gibt, die sog. bm-Serie, deren H-2K^{b} Antigene charakterisiert sind durch definierte Aminosäure-Substitutionen in den äußeren Domänen (Tabelle 2; Abb.15). Die Frage, die sich stellt ist, ob solche As-Austausche einen Einfluß auf bestimmte AK-Determinanten und damit auf die Bindung bestimmter Antikörper haben. Sollte dies der Fall sein, so könnte man bestimmte Determinanten auf dem H-2K^{b} Molekül bestimmten As-Substitutionen zuordnen und damit auch eine Aussage über die Lage der AK-Determinanten auf den Domänen treffen.
Hinsichtlich der Untersuchung, welche Erkennungsbereiche CTLs auf dem MHC-Antigen sehen, ergäbe sich die Möglichkeit, durch Targetinhibitionsexperimte zu vergleichen, ob die Antikörper und die CTLs die gleichen Bereiche erkennen oder nicht.

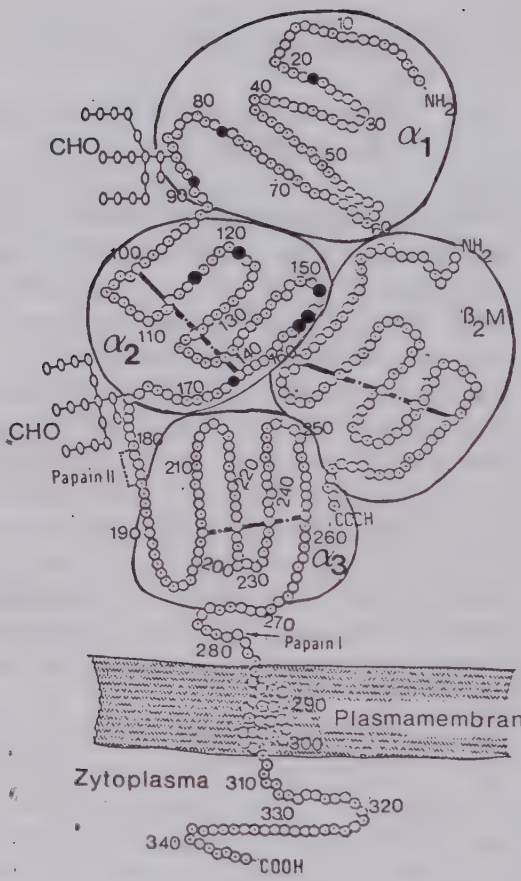


Abb. 15 Strukturmodell des H-2K^b Moleküls assoziiert mit ß$_2$-Mikroglobulin (ß2M), nach Coligan et al.,1981.

-NH$_2$: N-Terminus; -COOH: C-Terminus; CHO: Carbohydrat; -.-: Disulfidbrücke; α1 α2 und α3: Bezeichnung der drei externen Domänen des Moleküls; Papain I und II : Spaltstellen des Moleküls bei der Verdauung mit Papain.
● Position von Aminosäureaustauschen bei Keimbahnmutanten (Nairn et al., 1980a).

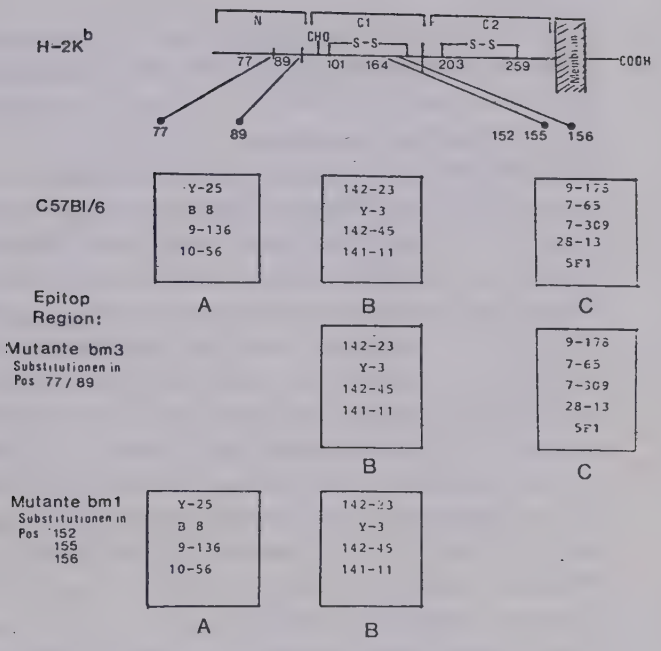


Abb. 16 Epitop Regionen auf dem H-2K^b und K^b Mutanten Molekülen

Die einzelnen Kästchen zeigen solche monoklonalen Antikörper, die sich untereinander blockieren und eine Epitop Region definieren. Der Wildtyp K^b wie auch die bm6 Moleküle exprimieren die Epitop Region A, B und C, während bm3 Mutanten nur Region B und C, und bm1 Mutanten nur Region A und B tragen.

(aus Rüsch, Kuon und Hämmerling, 1983)

Darüberhinaus kann man bestimmen, wo genau solche CTL-Erkennungsbereiche auf den beiden äußeren Domänen lokalisiert sind. Dies wird im nächsten Versuch unter Punkt 3.6.2 eingehend erläutert.
Antikörperbindungsstudien mit monoklonalen Antikörpern auf H-$2K^b$ Mutantenzellen zeigen, daß die Aminosäuresubstitutionen auf dem MHC-Molekül einen Einfluß auf die Bindung der Antikörper haben. Analysen von verschiedenen bm-Mutantenmäusen in unserem Labor durch Hämmerling und Mitarbeiter ergaben, daß z.B. Aminosäureaustausche in den Positionen 77 und 89 (bm3 Mutante) auf der $\alpha 1$ Domäne das H-2 Antigen dergestalt verändern, daß die Antikörper, die auf dem H-$2K^b$ Wildtypmolekül die Gruppe A bilden, nicht mehr in der Lage sind, zu binden. Umgekehrt führen Aminosäuresubstitutionen in den Positionen 152, 155 und 156 (bm1 Mutante) dazu, daß die Antikörper der Gruppe C nicht mehr binden können, während alle anderen Antikörper unbeeinflußt bleiben und binden (Abb.16) .
Daraus wurde geschlossen, daß die Allodeterminanten auf dem Molekül in einigen von einander getrennten Regionen konzentriert sind, die sich offenbar auf die $\alpha 1$ und $\alpha 2$ Domänen erstrecken und durch die Aminosäuresubstitutionen lokalisiert werden können. Eine Ausnahme bilden die As-Substitutionen in den Positionen 116 und 121 (bm6 Mutante), die nicht die antigene Bindung der monoklonalen K^b-Antikörper beeinflussen, obwohl man Zellyse durch C57Bl/6 anti bm6 CTLs von bm6 Targetzellen beobachtet (Klein 1978).

3.6.2 Bestimmung von Erkennungsbereichen für zytotoxische T-Zellen aus Massenkulturen auf bm-Mutanten

Wie unter 3.6.1 dargestellt, ergaben die Untersuchungen der verschiedenen bm-Mutanten, daß sich z.B. die bm3-Mutante mit den Aminosäuresubstitutionen in Position 77 und 89 serologisch vom H-$2K^b$ Wildtypmolekül nur in der Epitop-RegionAunterscheidet, während dies für die bm1 Mutante mit den Aminosäureveränderungen in Position 152, 155 und 156 für die Epitop-Region C gilt.
Wir spekulierten nun, daß CTLs, die z.B. in einer bm3 - Mutante gegen C57Bl/6 H-$2K^b$ Wildtyp induziert würden, vorzugsweise gegen Epitop-Region A gerichtet sein müßten, und bevorzugt von den Antikörpern der Gruppe A inhibiert werden sollten, unter der Voraussetzung, daß die Killerzellen und die anti-K^b Antikörper die gleichen oder ähnliche Erkennungsbereiche auf dem H-$2K^b$ Molekül sehen. Diese Annahme sollte auch für andere entsprechende Mutanten gelten. Sollte die Hypothese stimmen, dann sollten die resultierenden CTLs gegen Region A auf dem C57Bl/6 Molekül speziell durch solche Antikörper bei der Lyse von EL4 Targets (H-2^b) inhibiert werden, deren Determinanten auf dem H-$2K^b$ Molekül in Region A lokalisiert sind.Umgekehrt sollten bm1 anti-B6 CTLs, die vornehmlich gegen Region C gerichtet sein sollten, speziell durch Antikörper dieses Bereiches blockiert werden.
Dieser theoretische Ansatz ist als Modell in Abb. 17 dargestellt.

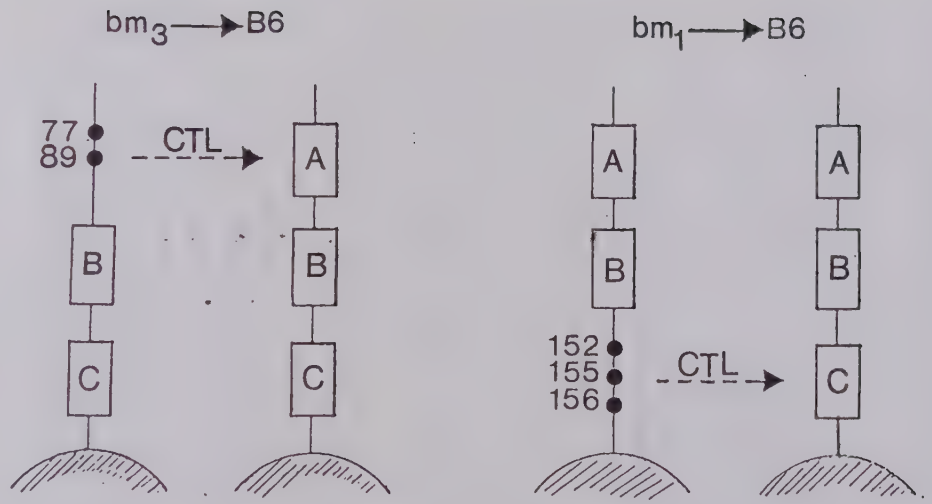


Abb. 17 Darstellung der Unterschiede in den Antikörper definierten Epitop-Regionen von bm-Mutanten und K^b Wildtypmolekülen und mögliche Feinspezifität von bm anti-B6 CTLs.

3.6.3 Ergebnisse der Inhibition von bm-Mutanten CTLs

Die Ergebnisse der Inhibitionsexperimente sind in Abb.18 wiedergegeben. Es zeigt sich, daß in den beiden Kombinationen es im Prinzip die gleichen Antikörper sind, die inhibieren bzw. nicht inhibieren. Dies Resultat wurde auch für bm11 und bm4 Mutanten erhalten. Es spielt keine Rolle, mit welcher Region des H-2 Moleküls die Antikörper reagieren. Keine der drei Antikörpergruppen blockiert die CTLs präferentiell. Wiederum gibt es die drei bekannten Gruppen: Antikörper, die keinen hemmenden Einfluß auf die EL4 Targetlyse ausüben. Es handelt sich dabei um die schon aus den vorangegangenen Experimente bekannten Antikörper: K9-136, y-25, H142-32, 28-13-3s und 5F.1.
Mittelstark hemmen die Antikorper K10-56, H141-11, H142-45, K7-65 und K9-178.
Stark inhibieren die Targetlyse dagegen der B8-24-3 und eine Mischung (Mix) aus allen Antikörpermolekülen. Der Kontroll-Antikörper X63 (aus Ascites von MOPC21) inhibiert erwartungsgemäß nicht.
Eine Besonderheit zeigt der y-3. Während er in der Kombination bm1 anti-B6 überhaupt nicht inhibiert, zeigt er in der Kombination bm3 anti-B6 bei einer Verdünnung von 1:50 eine hemmende Wirkung. Bei steigender Verdünnung des Antikörpers geht die hemmende Wirkung aber schnell zurück und ist bereits bei einer Verdünnung von 1:500 aufgehoben.

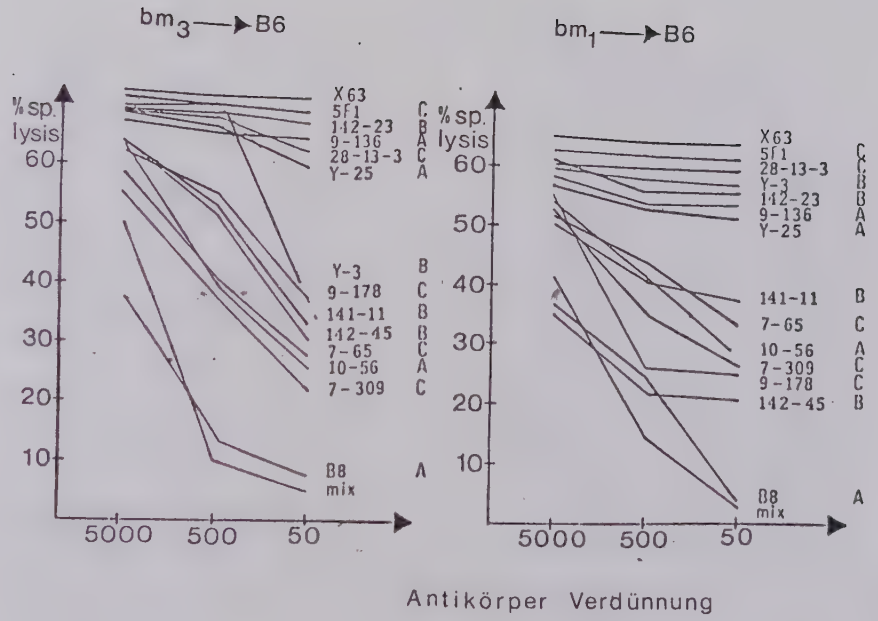


Abb. 18 Lyse von EL4 Tumorzellen ($H\text{-}2^b$) durch bm3 anti-B6 und bm1-anti-B6 CTLs nach Inhibition der Targets mit $H\text{-}2K^b$ spez. monokl. Antikörpern; E:T/50:1; Mix: aus allen AK;X63: aus MOPC21; A,B,C: zugehörige Gruppe des Antikörpers auf dem K^b Wildtypmolekül.

3.7 Limiting Dilution Analysen

3.7.1 Limiting Dilution von bm-Mutanten CTLs und Analyse der CTL Klone mit Targetinhibitionsexperimenten

Die unter Punkt 3.6.3 geschilderten Experimente mit bm anti-B6 CTLs wurden mit klonierten CTLs aus Grenzverdünnungsexperimenten (Limiting Dilution) wiederholt. Dafür sprachen folgende Überlegungen: In allen bisher vorgenommenen Experimenten stammten die CTLs aus Massenkulturen. Gemischte Lymphozyten Kulturen enthalten eine Vielzahl von CTL-Vorläuferzellen. Diese Vorläuferzellen werden nach Antigenkontakt stimuliert, sich zu zytotoxischen T-Zellen zu entwickeln. Obwohl sie alle gegen das gleiche Antigen gerichtet sind, tragen sie doch Spezifitäten für unterschiedliche antigene Determinanten. (Sherman et al.,1982). Andererseits ist zu erwarten, daß CTLs, die aus nur einer bestimmten zytotoxischen T-Zelle durch klonale Expansion hervorgegangen sind, auch nur Spezifität für eine bestimmte Antigene Determinante bzw. für einen bestimmten antigenen Bereich zeigen. Es ist daher zu untersuchen, ob klonierte CTLs nach Antikörperinhibition im Gegensatz zu CTLs aus Massenkulturen nicht ein anderes Inhibitionsmuster aufweisen. Die Überlegung war, daß es mit individuellen CTL Klonen gelingen könnte, zu erfahren, ob Antikörper einer bestimmten Gruppe (A,B oder C;Punkt 3.5.1) präferentiell die bm anti-B6 CTLs inhibieren, oder ob Antikörper und CTLs unterschiedliche Bereiche erkennen.
Die Limiting Dilution Klone für bm anti-B6 CTLs wurden angelegt wie unter 2.7.3.2 beschrieben und in Abb. 19 skizziert. Massenkulturen (Bulk Culture) von bm1 anti-B6 und bm3 ant-B6 CTLs wurden in kleinen Kulturfläschchen angesetzt,Responder- und bestrahlte Stimulatorzellen für fünf bis sechs Tage inkubiert und die CTLs anschließend in verschiedenen Zell - konzentrationen in 96ger Rundbodenplatten austitriert.

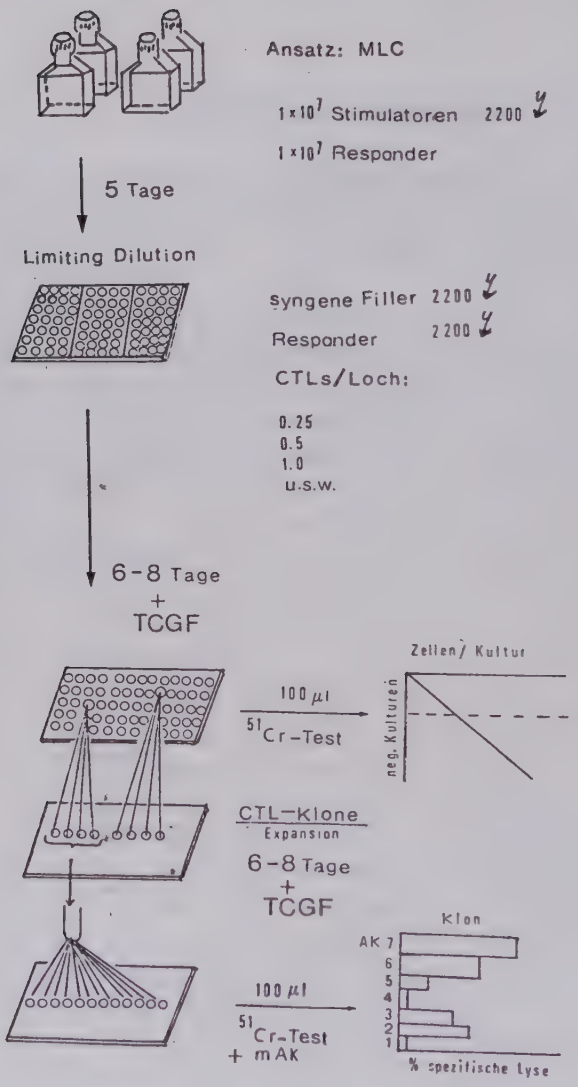


Abb. 19 Limiting Dilution von bm Mutanten CTLs und Analyse der CTL-Kurzzeit-Klone mit Targetinhibitionsexperimenten

Von jeder Zellkonzentration wurden jeweils 24 Löcher auf der Platte mit zusätzlich jeweils $1x10^6$ bestrahlten Stimulatoren und $1x10^6$ bestrahlten Zellen aus dem gleichen Stamm , wie die Responderzellen (Fillerzellen),angelegt. Das Medium enhielt 8-10% TCGF. Alle zwei Tage wurden den Vertiefungen auf der Platte 100 µl Medium entnommen, und die Zellen mit frischem Medium (100µl) gefüttert. Das Zellwachstum wurde optisch im Mikroskop verfolgt. Nach ca.6-8 Tagen wurden die Zellkulturen unter sterilen Bedingungen geteilt. Während ein Teil der Zellen im Inkubator weiter inkubiert wurde, wurde die andere Hälfte der CTLs auf klonale Verteilung hin untersucht. Positive Löcher, d.h. solche Vertiefungen, in denen statistisch nach der Poisson Verteilung Zellen wuchsen, die aus nur einer zytotoxischen T-Zelle hervorgegangen waren, wurden weiter in TCGF expandiert und mit syngenen Fillern erneut restimuliert. Mit den Zellen wurde danach weiter verfahren, wie bereits für den ersten Teil des Versuchs dargestellt. Nach 8-10 Tagen, eventuell auch länger, was von der Geschwindigkeitdes Zellwachstums abhing, wurden die in verschiedenen Vertiefungen expandierten Zellen jeweils eines Klons wieder vereinigt und auf ihre lytische Aktivität auf verschiedenen Zielzellen getestet. Die Mikrokulturen wurden möglichst soweit expandiert, daß sie auf bis zu vierzehn verschiedenen Zielzellen gleichzeitig getestet werden konnten.

Es gibt eine Reihe von Problemen bei der Expansion bzw. Klonierung der CTLs. Folgendes Problem taucht z.B. bei der Expansion der CTLs auf: CTLs, die im ^{51}Cr-Test das Target lysierten und nach der Poisson Verteilung statistisch aus nur einer zytotoxischen T-Zelle hervorgegangen waren, müssen erneut expandiert werden. Dies geschieht, indem die verbliebenen , zurückbehaltenen Zellen (100 µl), auf mehrere Löcher aufgeteilt werden. Dabei kann es passieren, daß die Zellen so stark ausverdünnt werden, daß sie nicht

wieder hochwachsen. Darin besteht eine Möglichkeit, Klone zu verlieren. Eine weitere ist dadurch gegeben, daß es Klone gibt, in denen die CTLs schneller wachsen, während andere z.B. langsamer hochwachsen. Dadurch kann es passieren, daß an dem Tag, an dem alle Klone getestet werden sollen, bereits einige CTL-Klone soweit expandiert wurden, daß sie, zumal in dem geringen Volumen, keine Aktivität mehr zeigen können, da die Zellen bereits abgestorben sind. Im Durchschnitt blieben aber noch 60-70% der expandierten CTL-Klone zytotoxisch aktiv. Die Klone wurden zum Teil bis zu zweimal restimuliert. Für unsere Experimente war es nicht notwendig, permanente CTL-Klone anzulegen, da Kurzzeitklone ebenso ihren Zweck erfüllten.

3.7.2 Bestimmung der klonalen Frequenzen der bm - Mutanten CTLs

In den Abbildungen 20a und 20b sind die klonalen Frequenzen der bm1 anti-B6 und bm3 anti-B6 CTLs gezeigt. Die Frequenzen liegen zwischen 1/17 und 1/34.

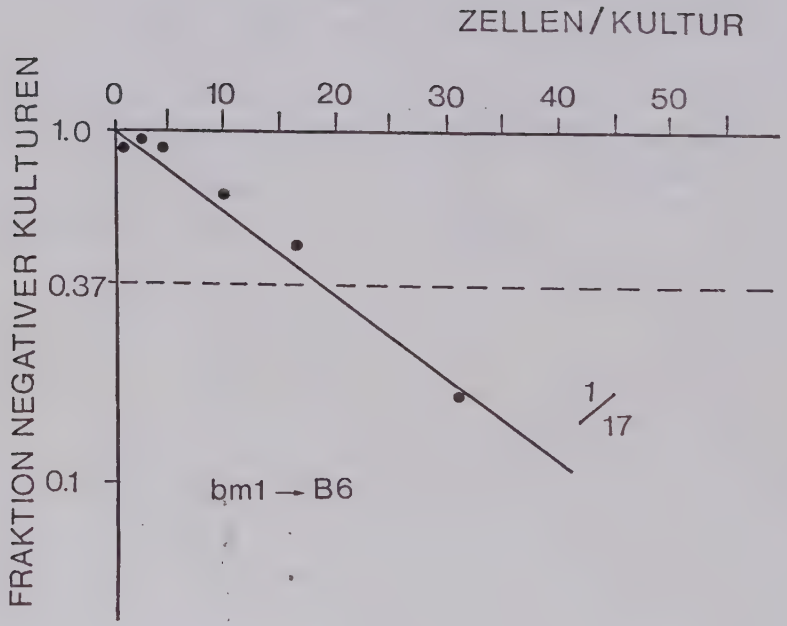


Abb. 20a Klonale Frequenz von bm1 anti-B6 spezifischen zytotoxischen T-Zellen

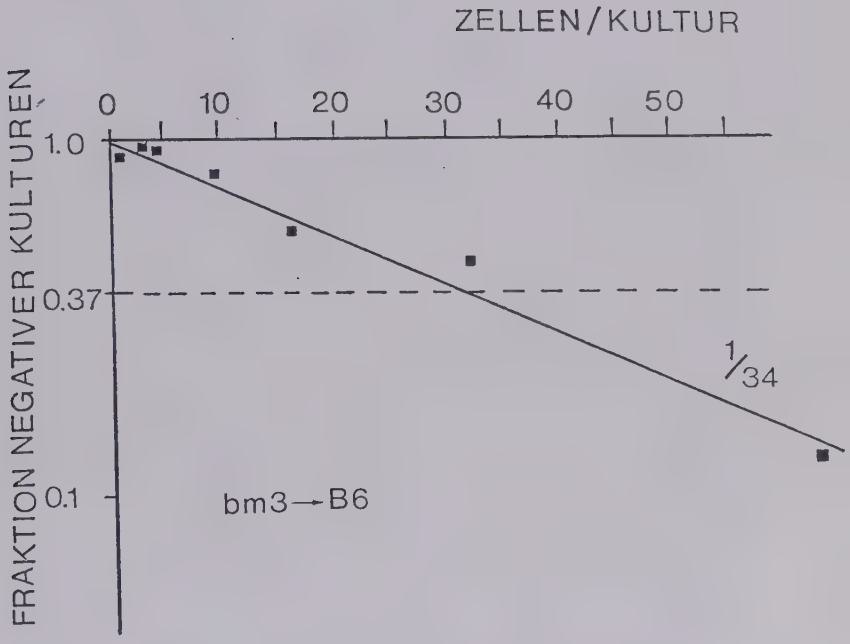


Abb. 20b Klonale Frequenz von bm3 anti-B6 spezifischen zytotoxischen T-Zellen

3.7.3 Ergebnisse der Targetinhibition von Mutanten CTL Klonen mit monoklonalen Antikörpern

Die Targetinhibitions-Experimente (Punkt 3.6.3) mit CTLs aus Mutante anti-B6 Kombinationen wurden mit klonierten CTLs wiederholt. Die Abbildungen 21a und 21b geben einige der Ergebnisse mit bm3 anti-B6 und bm1 anti-B6 CTL Klonen wieder.
Fast alle CTL Klone zeigen nach Targetinhibition mit den verschiedenen Antikörpern die gleichen Inhibitionsmuster, wie sie aus den Experimenten mit den bm anti-B6 CTLs aus Massenkulturen gewonnen wurden. Ein Unterschied gradueller Art besteht höchstens darin, daß inhibierende Antikörper auf klonaler Ebene dies zum Teil noch deutlicher zeigen, als dies mit CTLs aus Massenkulturen der Fall ist. Die Inhibitionsmuster der CTL Klone unterscheiden sich ansonsten untereinander oder im Vergleich zu den früheren Ergebnissen nur sehr wenig von einander. Andererseits könnte es für einige wenige Klone und für einige Antikörper so aussehen, als ob hier die Antikörper die CTLs nicht mehr inhibieren. Solche Fälle sind in der Abb. 21a und 21b durch straffierte Kästchen hervorgehoben. Daraus ließe sich der Schluß ableiten, daß es auf klonaler Ebene für einige Antikörper zu Unterschieden im Inhibitionsmuster kommt, verglichen mit CTLs aus Massenkulturen. Dies würde bedeuten, daß einige Antikörper Determinanten erkennen, die nicht von den CTLs erkannt werden, was darauf hindeuten würde, daß CTLs und Antikörper unterschiedliche Bereiche auf dem MHC-Antigen erkennen.
Es muß aber betont werden, daß die hier dargestellten Ergebnisse für die einzelnen Antikörper auf jeweils Einzelmessungen beruhen, und dadurch nicht gut abgesichert sind. Andererseits zeigen die Kontrollen die gute Übereinstimmung und Genauigkeit der Messwerte. Warum nur Einzelwerte gemessen werden konnten, wird im Diskussionsteil genauer erläutert (4.3).

Target-Inhibition von bm3 anti-B6 CTL Klonen durch K^b spezifische monokl. AK

Abb. 21a

*) AK-Verdünnung 1:100; E:T Verhältnis 50:1

Kontrollen: Medium; ^{51}Cr-markierte EL4 plus CTLs
X63 ; Targets inhibiert mit X63(1:100, γ_1/κ aus MOPC 21)
TNP ; Targets inhibiert mit anti-TNP AK (1:100)

//// : Inhibitionsmuster , die von CTL-Massenkulturen abweichen

Target-Inhibition von bm1 anti-B6 CTL Klonen durch K^b spezifische monokl. AK

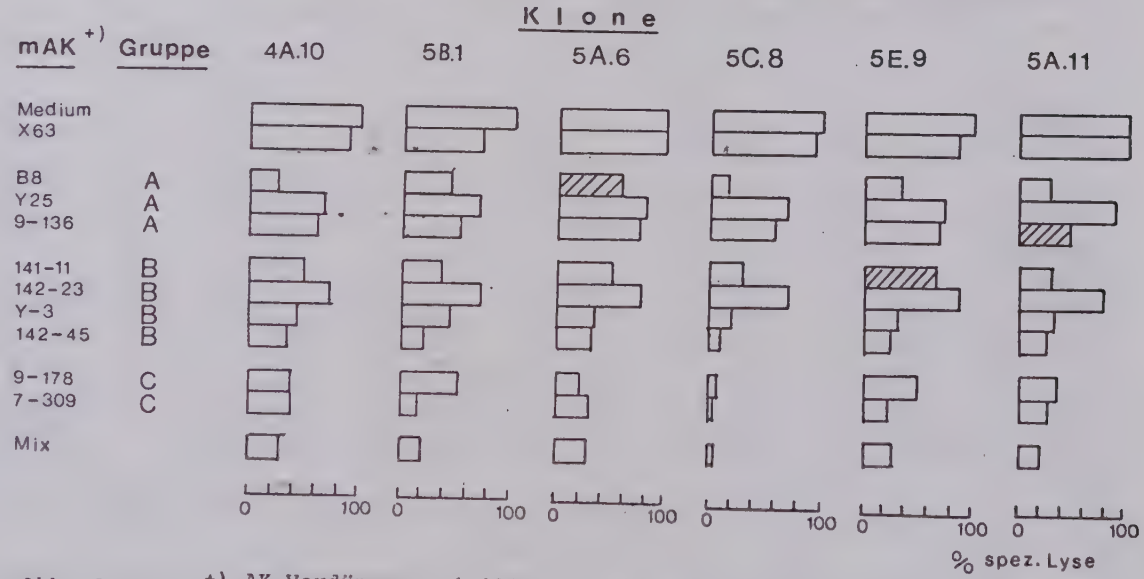


Abb. 21b

+) AK-Verdünnung 1:100; E:T Verhältnis 50:1

Kontrollen: Medium; ^{51}Cr-markierte EL4 plus CTLs
X63 ; Targets inhibiert mit X63 (1:100, IgG1/κ aus MOPC21)
TNP ; Targets inhibiert mit anti-TNP AK(1:100)
//// : Inhibitionsmuster, die von CTL-Massenkulturen abweichen

3.8 Analyse von Erkennungsbereichen für zytotoxische T-Zellen mit Hilfe genetisch modifizierter H-2K^d, H-2K^k und H-2K^b Antigene

3.8.1 Vorteil der Methode

Im folgenden Teil der Arbeit werden Experimente vorgestellt, die mit H-2 Hybridmolekülen durchgeführt wurden. Aus der Kombination verschiedener H-2 Allele wurden neue Hybridgene erhalten, bei denen die Abschnitte für die äußeren Domänen $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 3$, sowie für den zytoplasmatischen Teil durch die Gensequenz eines anderen H-2 K Allels ausgetauscht wurden.
Die folgenden Versuche sollen klären, welchen Einfluß der Austausch bestimmter Domänen auf dem MHC -Antigen auf die Erkennung der Zielzellen durch entsprechende zytotoxische T-Zellen (CTLs) hat.
Die Methode, allele Bereich, die für die verschiedenen Bereiche des MHC-Antigens kodieren, durch Austausch zu modifizieren, ermöglicht es, direkt auf molekularer Ebene die Bedeutung und Funktion unterschiedlicher H-2 Domänen auf dem MHC-Protein zu studieren.

3.8.2 Lyse von H-2K^d-K^k Hybridgen transfizierten H-2^q Maus-Fibroblastenzellen durch alloreaktive CTLs

Das folgende Experiment sollte klären, ob der Austausch der äußeren Domänen Einfluß auf die Erkennung der MHC-Antigene und die Lyse der Zielzellen durch CTLs hat.

Für den Versuch wurden anti H-2K^k (DBA/2 anti A/J^y) und anti H-2K^d (C57Bl/6 anti B10.GD^y) spezifische CTLs in Massenkulturen induziert. Die CTLs wurden auf acht verschiedenen Chrom markierten Zielzellen getestet. Das E:T Verhältnis betrug 50:1.

Das Ergebnis zweier Experimente ist in Tabelle 5 zusammengestellt.

Beide Killerzellkulturen wurden im gleichen Experiment jeweils auf den ^{51}Cr markierten Targets getestet. Um zu prüfen bzw. auszuschließen, daß die H-$2K^d$ und H-$2K^k$ spezifischen CTLs mit H-2^q unspezifisch reagieren, wurden sie auf dem 1T 22-6 Target getestet, der Parentallinie der transfizierten H-2^q Fibroblastenzellen. Die Ergebnisse zeigen, daß es zu keiner unspezifischen Wechselwirkung kommt.

Im Falle der anti H-$2K^k$ CTLs werden sowohl das L929 L-Zelltarget (H-2^k) , als auch das transfizierte I27S414 Maus-Fibroblastentarget (H-$2K^k$) lysiert. Negativ ist dagegen die Lyse des P815 L-Zelltargets (H-2^d), sowie die Lyse der H-$2K^d$ transfizierten Linie 214.4 (H-$2K^d$).

Umgekehrt gilt für die anti H-$2K^d$ CTLs, daß sie das P815 L-Zelltarget (H-2^d) und das 214.4 H-$2K^d$ transfizierte Target erkennen, nicht aber L929 (H-2^k) und das H-$2K^k$ transfizierte Target I27S414. Im letzteren Fall kommt es in einem der beiden dargestellten Experimente zu einer leichten Reaktion mit dem Target, dem aber wohl keine größere Bedeutung zu zumessen ist.

Wie verhalten sich die CTLs nun im Hinblick auf die Erkennung und Lyse der H-$2K^d$-K^k Hybridgen transfizierten Zielzellen?

Im Falle der anti H-$2K^k$ CTLs findet man folgende Resultate: Im Unterschied zum Target I27S414, bei dem das gesamte H-$2K^k$ Allel transfiziert wurde (äußere Domänen $K^kK^kK^k$), wird das Target C32-4 (äußere Domänen $K^dK^dK^d$) nicht erkannt. Erkannt wird ebensowenig das transfizierte Target C33-2 (äußere Domänen $K^dK^dK^k$). In diesem Fall wurde die dritte Domäne auf dem MHC-Antigen gegen die α3-Domäne von K^k ausgetauscht. Beim Target C31-47 (äußere Domänen $K^dK^kK^k$)

stammt die $\alpha 1$ Domäne vom H-2K^d Allel, während die $\alpha 2$ und $\alpha 3$ Domänen, der Membranteil (TM) und der zytoplasmatische Bereich (CP) des Proteins vom H-2K^k Allel kommen. Auch im letzteren Fall erkennen und lysieren die anti H-2K^k CTLs das Target nicht!

Zu welchen Ergebnissen gelangt man umgekehrt mit den anti H-2K^d spezifischen CTLs?

Hier ergibt sich ein anderes Bild. Werden alle äußeren Domänen, $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 3$ des H-2K^d Moleküls auf dem C32-4 Target exprimiert, während der verbleibende Teil des MHC-Antigens (TM, CP) vom K^k-Allel stammen, wird das Target von den H-2K^d spez. CTLs erkannt und lysiert. Exprimiert die transfizierte Zelle nur die beiden äußeren Domänen $\alpha 1$ und $\alpha 2$ vom K^d-Typ (C33-2), während die $\alpha 3$ Domäne , TM und CP auf das K^k-Allel zurückgehen (C33-2, äußere Domänen $K^dK^dK^k$) , so erkennen die H-2K^d spez. CTLs das Target ebenfalls. Im Vergleich dazu erkannten die anti H-2K^k CTLs dieses MHC-Antigen nicht. Tauscht man schließlich die $\alpha 2$ und $\alpha 3$ Domänen, sowie den verbleibenden Teil (TM, CP) gegen Strukturen vom H-2K^k Allel aus (C31-47), so daß nur noch die äußere Domäne $\alpha 1$ vom H-2K^d Typ vorliegt ($K^dK^kK^k$), dann sind auch die H-2K^d spez. CTLs nicht mehr in der Lage das Target zu lysieren, da sie das Hybridantigen nicht mehr erkennen.

Aus diesen Ergebnissen muß man folgenden Schluß ziehen:

1.) die $\alpha 2$ und $\alpha 3$ Domänen werden für sich alleine nicht erkannt (anti-K^d CTLs gegen C33-2)
2.) die äußere Domäne $\alpha 1$ alleine reicht nicht aus, um Targetlyse hervorzurufen (anti-K^d CTLs gegen C31-47)
3.) die allele Struktur der $\alpha 3$ Domäne alleine spielt keine Rolle für die CTL-Erkennung (anti-K^k CTLs gegen C33-2)
4.) die Zielzellen werden nur erkannt und lysiert, wenn die $\alpha 1$ Domäne und die $\alpha 2$ Domäne unverändert erhalten bleiben (anti-K^d CTLs gegen C33-2).

Tabelle 5 Lyse von H-2K^d-K^k Hybridgen transfizierten (H-2^q) Maus-Fibroblastenzellen** durch alloreaktive CTLs

Target	Haplotyp	Struktur des transfizierten H-2 Gens $\alpha 1\alpha 2\alpha 3$/TM/CP	% spez. Lyse+) anti-K^d Exp.1	(Exp.2)	anti-K^k Exp.1	(Exp.2)
L929	H-2^k		7.1	(5.2)	35.7	(38.1)
P815	H-2^d		63.2	(61.7)	2.6	(9.6)
1T 22-6*	H-2^q		4.9	(5.3)	5.0	(7.8)
214.4	H-2^q	+ H-2K^d	23.9	(41.5)	7.7	(7.2)
C32-4	H-2^q	+ K^{d}K^{d}K^d/K^k/K^k	47.5	(33.3)	7.7	(9.7)
C33-2	H-2^q	+ K^{d}K^{d}K^k/K^k/K^k	42.9	(27.2)	3.3	(5.6)
C31-47	H-2^q	+ K^{d}K^{k}K^k/K^k/K^k	3.8	(6.3)	0.0	(4.8)
I27S414	H-2^q	+ H-2K^k	15.8	(8.2)	36.9	(44.8)

** von Dr. B. Arnold und Dr. S. Kvist

* ursprünglich von Dr. M. Nabholz

+) gemessen wurde % spezifische Lyse als ^{51}Cr-Freisetzung:

$$\text{Spez. Freisetzung} \triangleq \frac{\text{exp. Frs. - spont. Frs.}}{\text{max. Frs. - spont. Frs}} \times 100$$

Es wurden Triplikat-Werte bestimmt; E:T Verhältnis von 50:1;

$\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3$: äußeren Domänen; TM: Membranteil; CP: zytoplasmatischer Teil;

3.8.3 Lyse von H-2K^b-K^k Hybridgen transfizierten H-2^q Maus-Fibroblastenzellen durch allo - reaktive CTLs

In diesem Experiment wurde untersucht, welchen Einfluß die Modifikation des zytoplasmatischen Bereichs auf die Erkennung des MHC-Antigens durch alloreaktive CTLs hat. Tab.6.
Untersuchungen mit anti H-2K^k (Balb/c anti A/J) und anti-H-2K^b (Balb/c anti B10.A (5R)) spez. CTLs führten zu folgenden Resultaten:
H-2K^b spez. CTLs lysieren Zielzellen, die mit dem gesamten H-2K^b Allel transfiziert wurden ebenso effektiv, wie Zellen , die das im zytoplasmatischen Bereich modifizierte Allel (K^{b}K^{b}K^b/K^b/K^k) auf ihrer Zelloberfläche exprimieren.

Die Modifikation des zytoplasmatischen Bereichs hat keinen Einfluß auf die Erkennung des MHC-Antigens durch die alloreaktiven H-2K^b spez. CTLs.

Tabelle 6 Lyse von H-2K^b-K^k Hybridgen transfizierten ($H\text{-}2^q$) Maus-Fibroblastenzellen** durch alloreaktive CTLs

Target	Haplotyp	Struktur des transfizierten H-2 Gens $\alpha 1 \alpha 2\ \alpha 3$/TM/CP	% spez. Lyse+) anti-K^b	anti-K^k
L929	$H\text{-}2^k$		5.2	46.3
EL4	$H\text{-}2^b$		62.1	8.2
IT 22.6*	$H\text{-}2^q$		6.0	3.2
IM3	$H\text{-}2^q$ +	H-2K^b	37.2	4.3
I27S414	$H\text{-}2^q$ +	H-2K^k	2.2	62.3
M31	$H\text{-}2^q$ +	$K^bK^bK^b/K^b/K^k$	36.8	8.2

** von Dr. B. Arnold und Dr. S. Kvist

* urspr. von Dr. M. Nabholz

+) gemessen wurde % spezifische Lyse als ^{51}Cr-Freisetzung:

$$\% \text{ spez. Freisetzung} = \frac{\text{exp. Frs. - spont. Frs.}}{\text{max. Frs. - spont. Frs.}} \times 100$$

Es wurden Triplikat-Werte bestimmt; E:T Verhältnis von 50:1;

$\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3$: äußere Domänen; TM: Membranteil; CP: zytoplasmatischer Bereich;

3.9 Limiting Dilution: Lyse von H-2K^d-K^k Hybridmolekül tragenden Targetzellen durch anti H-2K^d und anti H-2K^k spezifische CTL Klone

3.9.1 Darstellung der klonalen CTL-Frequenzen

Wie bereits in Kapitel 3.7.1 für bm-Mutanten CTL Klone beschrieben, wurden in der selben Weise Massenkulturen von anti H-2K^k und anti H-2K^d CTLs hergestellt, anschließend in Platten austitriert und auf Klone selektiert. Die klonale Frequenzbestimmung für die anti H-2K^d und anti H-2K^k CTLs ist in Abb. 22 gezeigt.
Für die K^d-CTLs liegt die klonale Frequenz bei 1/38, für die K^k CTLs bei 1/28. Im Vergleich mit weiteren Experimenten läßt sich sagen, daß die Klonalen CTL-Frequenzen für beide Zellpopulationen zwischen 1/28 - 1/60 lagen.

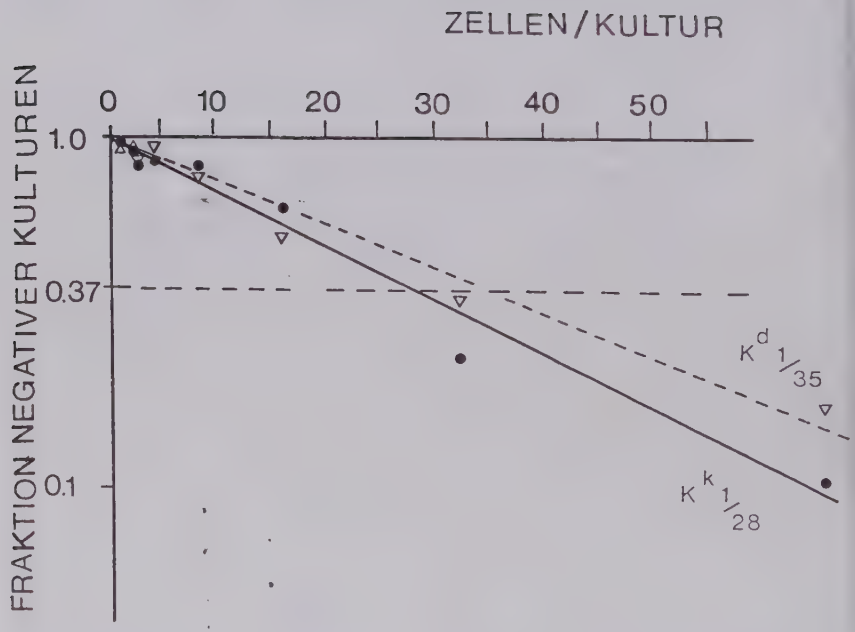


Abb. 22 Darstellung der klonalen Frequenzen von anti H-$2K^d$ (C57Bl/6 anti B10.GD) und anti H-$2K^k$ (B10. anti B10.A(4R)) spez. zytotoxischen T-Zellen (CTLs)

3.9.2 Reaktion von anti H-2K^d CTL Klonen mit H-2K^d-K^k Hybridmolekülen

Anti H-2K^d CTLs (C57Bl/6 anti B10.GD) wurden kloniert und die Lyse der ^{51}Cr markierten H-2K^d-K^k Hybridgen transfizierten Zellinien einschließlich der Parentallinie durch die klonierten H-2K^d und H-2K^k spez. CTLs bestimmt. Tabelle 7a zeigt die spezifischen Lysewerte (Einzelwerte) für die unterschiedlichen Zielzellen. Tabelle 7b gibt ein Experiment der gleichen Art wieder, in dem nur vier Targets untersucht, dafür aber Duplikate bestimmt wurden.
Obwohl die Lysewerte insgesamt etwas niedrig sind, ergibt sich doch folgendes Bild: die 12 in Tabelle 7a aufgeführten Klone zeigen keine Kreuzreaktion mit der 1T 22-6 Parentallinie (H-2^q). Die H-2K^d spez. CTL Klone sind nicht in der Lage, das Target I27S414 (mit den äußeren Domänen $K^kK^kK^k$) und C31-47 Zielzellen ($K^dK^kK^k$) zu lysieren. Erkannt werden dagegen die Zielzellen 214.4 (H-2^d), C32-4 (äußere Domänen $K^dK^dK^d$) und C33-2 ($K^dK^dK^k$).
Der Versuch zeigt, daß die Resultate für die H-2K^d spez. CTL Klone mit den Ergebnissen übereinstimmen, die in Tab.6 für alloreaktive H-2K^d spez. CTLs aus Massenkulturen, die an den gleichen Zielzellen getestet wurden, gewonnen wurden.

In Tabelle 7b sind die Lyseergebnisse von neun weiteren anti H-2K^d spez. CTL Klonen dargestellt. Auch hier zeigen die anti H-2 K^d spez. CTLs die gleiche Präferenz, nur solche Zielzellen zu lysieren, die MHC-Antigene auf ihrer Oberfläche tragen, deren α1 und α2 Domänen vom gleichen Allel stammen. Das Target C31-47 (äußere Domänen $K^dK^kK^k$) wird nicht von den anti H-2K^d spez. CTLs erkannt.
Aus den Experimenten mit den anti-H-2K^d spez. CTL Klonen muß geschlossen werden, daß die beiden äußeren Domänen entscheiden, das das Target erkannt wird. Die α3 Domäne übt auf diese Entscheidung keinen sichtbaren Einfluß aus.

Tabelle 7a Lyse*) von H-$2K^d$-K^k Hybridgen transfizierten H-2^q Maus-Fibroblasten-zellen mit anti H-$2K^d$ CTL Klonen (C57Bl/6 anti B10.GD).

	Target:	1T 22-6 ($H\text{-}2^q$)	214.4 ($H\text{-}2K^d$)	C32-4 ($K^dK^dK^d$)	C33-2 ($K^dK^dK^k$)	C31-47 ($K^dK^kK^k$)	I27S414 ($H\text{-}2K^k$)
Klon	1	1	19	21	13	8	4
	2	- 3	16	16	18	6	3
	3	3	11	22	13	3	5
	4	- 8	16	22	18	7	9
	5	- 5	14	22	18	8	- 4
	6	- 2	20	13	21	1	1
	7	8	16	20	19	5	- 2
	8	- 3	11	13	16	9	2
	10	4	21	16	13	9	5
	11	2	26	27	26	8	6
	12	-10	18	20	21	0	3
	13	- 3	19	21	18	-2	3

*) es wurden Einzelwerte bestimmt; % spez. Lyse wurde als ^{51}Cr-Freisetzung ge - messen nach % spez. Freisetzung= $\frac{\text{exp. Frs. - Spont. Frs.}}{\text{max. Frs. - Spont. Frs.}} \times 100$; negative Werte ergeben sich dann, wenn der exp. Wert kleiner ist, als der Wert für die spontane ^{51}Cr-Freisetzung, der davon abgezogen wird; Lyse unter 10% wurde als nicht spez. angesehen; E:T Verhältnis 50:1; unter den Target- Linien sind die transf. Gene bzw. der Ursprung für die äußeren Domänen $\alpha 1$ $\alpha 2$ und $\alpha 3$ angegeben.

Tabelle 7b Lyse*) von H-2K^d-K^k Hybridgen transfizierten H-2^q Maus-Fibroblastenzellen mit anti H-2K^d CTL Klonen (C57Bl/6 anti B10.GD)

	Target:	214.4 (H-2K^d)	C32-4 (K^{d}K^{d}K^d)	C33-2 (K^{d}K^{d}K^k)	C31-47 (K^{d}K^{k}K^k)
Klon	1	24±1	18±1	17±1	- 1±1
	2	23±5	18±1	30±1	8±1
	3	28±4	15±1	32±3	0±
	4	13±1	18±2	11±1	- 1±2
	9	33±3	39±1	21±1	4±2
	10	19±2	24±2	20±2	2±1
	11	21±2	33±2	15±1	- 2±1
	14	23±1	25±1	18±2	- 1±1
	15	22±1	15±1	16±1	- 1±1

*) es wurden Duplikatwerte bestimmt; % spez. Lyse wurde als ^{51}Cr-Freisetzung gemessen nach % spez. Freisetzung= $\frac{\text{exp. Frs - spont. Frs.}}{\text{max. Frs.- spont. Frs.}} \times 100 \pm$ SD±

negative Werte ergeben sich dann, wenn der exp. Wert kleiner ist, als der Wert für die spontane ^{51}Cr-Freisetzung, der vom exp. Wert abgezogen wird; E:T/50:1; unter den Target-Linien Angabe der transf. Gene bzw. Ursprung für die äußeren Domänen α1, α2 und α3;Lyse unter 10% nicht spezifisch;

3.9.3 Reaktion von anti H-2K^k CTL Klonen mit H-2K^d-K^k Hybridmolekülen

Entsprechend den in Tabelle 7a und 7b aufgeführten Experimenten wurden auch anti H-2K^k spez. CTL Klone auf den modifizierten Zielzellen untersucht. Für die Induktion der anti-K^k spez. CTLs wurden zwei verschiedene Mauskombinationen gewählt. In Tabelle 8a sind CTL Klone aufgeführt, die aus der Kombination DBA/2 anti-A/J hervorgegangen sind, in Tabelle 8b solche aus der Kombination B10.anti B10.A(4R). Letztere Kombination wurde gewählt, da in zahlreichen Experimenten mit DBA/2 anti A/J CTL Klonen die Höhe der Lysewerte unbefriedigend blieb.
Aus allen Experimenten, wie sie die beiden Tabellen darstellen, Einzelmessergebnisse in Tabelle 8a, Duplikatwerte in Tabelle 8b, geht hervor, daß sie das Gegenteil zu den Experimenten mit den H-2K^d spz. CTL Klonen bilden. Nur das H-2K^k transfizierte Target I27S414 (H-2K^k) wird lysiert. Alle anderen Zielzellen werden nicht erkannt, auch dann nicht, wenn die α2 und α3 Domänen vom K^k -Allel stammen. Einzig der Klon 3 bildet eine Ausnahme, indem er offenbar unspezifisch alle Zielzellen lysiert.
Die Ergebnisse bestätigen im Kontext mit den Resultaten aus Tabelle 7a und 7b die Schlüsse , die dort gezogen wurden.

Tabelle 8a Lyse*) von H-2K^d-K^k Hybridgen transfizierten H-2^q Maus-Fibroblasten-zellen mit anti H-2K^k CTL Klonen (DBA/2 anti-A/J)

	Target:	1T 22-6 (H-2^q)	214.4 (H-2K^d)	C32-4 (K^{d}K^{d}K^d)	C33-2 (K^{d}K^{d}K^k)	C31-47 (K^{d}K^{k}K^k)	I27S414 (H-2K^k)	P815 (H-2^d)
Klon	1	- 2	2	6	6	2	30	4
	2	- 1	2	5	1	0	20	7
	3	0	4	2	2	3	23	5
	4	8	0	- 1	1	1	20	2
	5	5	4	- 7	2	1	13	0
	6	4	1	3	1	0	19	4

*) es wurden Einzelwerte bestimmt; % spez. Lyse wurde als ^{51}Cr-Freisetzung gemessen nach: % spez. Freisetzung= $\frac{\text{exp. Frs. - spont. Frs.}}{\text{max. Frs. - spont. Frs.}}$ x100;

negative Werte ergeben sich dann, wenn der exp. Wert kleiner ist , als der Wert der spontanen Frs., der vom exp. Wert abgezogen wird; Lyse unter 10% wurde als nicht spezifisch erachtet; E:T/50:1; unter den Target-Linien Angabe der transfiz. Gene bzw. Ursprung für die äußeren Domänen α1, α2 α 3;

Tabelle 8b Lyse*) von H-2K^d-K^k Hybridgen transfizierten H-2^q Maus-Fibroblastenzellen mit anti H-2K^k CTL Klonen (B10. anti B10.A(4R)

Target	1T 22-6 (H-2^q)	I27S414 (H-2K^k)	C32-4 ($K^dK^dK^d$)	C33-4 ($K^dK^dK^k$)	C31-47 ($K^dK^kK^k$)
Klon 1	- 1± 1	59± 1	8± 2	2± 0	1± 1
2	2± 3	36± 5	0± 1	1± 1	0
3	13± 2	21± 1	16± 3	13± 2	13± 1
4	3± 2	23± 1	- 3± 1	0	0
5	- 1± 1	19± 2	2± 1	8± 1	8± 2
6	- 2± 2	21± 2	12± 1	2± 3	8± 1
7	- 1± 1	28± 3	5± 2	5± 1	4± 2
8	- 1± 3	22± 4	8± 1	4± 1	3± 1
9	- 3± 1	42± 4	2± 2	3± 1	1± 1
10	- 7± 1	51± 7	3± 3	8± 0	2± 2

*) es wurden Duplikatwerte bestimmt; % spez. Lyse wurde als ^{51}Cr-Freisetzung gemessen nach: % spez. Freisetzung= $\frac{\text{exp. Frs. - spont. Frs.}}{\text{max. Frs. - spont. Frs.}}$ x100+SD±

Lysewerte unter 10% wurden als nicht spez. angesehen; negative Lyseergebnisse ergeben sich dann, wenn der exp. Wert kleiner ist, als der Wert für die spontane Freisetzung an ^{51}Cr, der vom exp. Wert abgezogen wird; E:T Verhältnis 50:1; unter den Targetlinien Angabe der transfiz. Gene bzw. Ursprung des Gens für die äußeren Domänen α1, α2 und α3;

4 Diskussion

Zwei unterschiedliche Ansätze zur Bestimmung funktionell wichtiger Erkennungsbereiche für CTLs auf H-2 Molekülen wurden gewählt.

Erstens: die Methode der Targetinhibition von CTLs mit monoklonalen Antikörpern. Zielzellen wurden mit $H\text{-}2K^b$ spez. Antikörpern vorinkubiert, um zu vergleichen, ob CTLs und Antikörper, die gegen das gleiche Target gerichtet sind, die gleichen oder unterschiedliche Bereiche auf dem MHC-Antigen erkennen.

Zweitens: die Methode der Modifizierung von MHC-Allelen, insbesondere solcher alleler Sequenzen, die für die äußeren Domänen und den zytoplasmatischen Bereich des MHC-Antigens kodieren. Aus verschiedenen H-2 K Allelen wurden Hybridgene erhalten (Arnold et al.,1984) und untersucht, welchen Einfluß die Modifikation verschiedener Bereiche auf dem MHC-Antigen auf die Erkennung durch CTLs und die Lyse der Zielzellen hat.

4.1 Quantitative und qualitative Antikörperbestimmung

Die Ammonsulfat gefällten Asciten wurden im CRIA, FACS und durch Immunopräzipitation charakterisiert , um festzustellen, ob in allen Asciten in etwa die gleiche Antikörpermenge enthalten ist. Dies ist eine Voraussetzung dafür, daß die Ergebnisse der Targetinhibitionsexperimente vergleichend analysiert werden können.

Alle Antikörper zeigen in den CRIA und FACS Analysen deutliche Titration. Die CRIA-Kurven weisen insbesondere für eine Aszitesverdünnung von 1:100 -1:500 cpm-Werte für die einzelnen Antikörper auf , die sehr ähnlich sind.

Es wird deshalb darauf hingewiesen, da die 1:100 Verdunnung für die Antikörper in allen Targetinhibitionsexperimenten u.a. eingesetzt wurde. Insgesamt zeichnen sich alle Titrations - kurven für die Asziten durch ähnlichen Verlauf aus. Man kann deshalb schließen, daß die Asziten, insbesondere bei den erwähnten Verdünnungen, vergleichbare Mengen an Antikörpern enthalten, wenn man einmal voraussetzt, daß die Affinität der Antikörper im wesentlichen ähnlich ist.
Noch deutlicher zeigt die FACS-Analyse in Abb.7a, daß die Menge an Antikörpern bei einer Verdünnung zwischen 1:50 und 1:100 vergleichbar hoch ist. Bei diesen Aszitesverdünnungen sind alle Zellen mit Antikörpern abgesättigt. Bei einer 1:50 und 1:100 Verdünnung ist die Menge an Antikörpern in den verschiedenen Asziten so hoch, daß alle antigenen Determinanten auf dem H-2K^{b} (EL4 Target) Molekül markiert sind. Da besonders bei den 1:50 und 1:100 Verdünnungen die Antikörpermenge in den Asziten vergleichbar hoch ist, folgt daraus, daß auch die Inhibitionsexperimente für die verschiedenen Antikörper ver - glichen werden können. Erst mit steigender Titration der Antikörper fallen die Titrationskurven in Abb. 7a ab. Dabei wird deutlich, daß im Vergleich zu den anderen Antikörpern der y-25, K7-65 und der 142-23 insgesamt in quantitativ geringerer Menge in den Asziten vorkommen. Dies scheint auch die Immunpräzipitation zu bestätigen, bei der diese Antikörper das H-2K^{b} Zellysat nur schwach präzipitieren. In den Targetinhibitionsexperimenten zeigen zwei dieser Antikörper, y-25 und H141-23 auch bei einer 1:50 und 1:100 Verdünnung keine Targetinhibition. Der 7-65 inhibiert CTLs dagegen auch noch bei Verdünnungen bis ungefähr 1:1000.
Da gezeigt wurde, daß auch Antikörper, die in Targetinhibitionsexperimenten nicht inhibieren, obwohl sie bei 1:50 und 1:100 Verdünnungen in ähnlich hoher Menge vorkommen, wie Antikörper, die inhibierend wirken, muß man folgern, daß es andere als quantitative Gründe sind, wenn bestimmte Antikörper nach Targetinhibition inhibierend auf die Targetlyse durch CTLs wirken, während andere Antikörper keinen inhibitorischen Effekt zeigen.

4.2 Erörterung der Targetinhibitionsexperimente mit CTL Massenkulturen

In den Targetinhibitionsexperimenten sollte verglichen werden, ob monoklonale Antikörper und zytotoxische T-Zellen, die beide gegen die gleiche Epitopregion gerichtet sind, die gleichen, oder verschiedene Bereiche auf dem MHC-Antigen erkennen.
Aus Untersuchungen von Hämmerling und Mitarbeitern (1982) am K^b-Molekül im Vergleich mit K^b-Mutanten geht hervor, daß die H-$2K^b$ Antikörper definierte Bereiche auf dem H-$2K^b$ Molekül erkennen. Die Determinanten für die H-$2K^b$ Antikörper sind auf zwei bis drei Bereiche auf dem Antigen konzentriert, die auf den beiden äußeren Domänen $\alpha 1$ und $\alpha 2$ liegen. Blokkierungsexperimete mit den Antikörpern zeigen, daß sich Antikörper innerhalb einer Gruppe gegenseitig blockieren, daß dies aber nicht der Fall ist, für Antikörper aus unterschiedlichen Gruppen.
Stellen diese Regionen auch die Erkennungsregionen für zytotoxische T-Zellen dar?
Um dies zu prüfen wurden CTLs in Massenkulturen gegen diese Allodeterminanten induziert und untersucht, ob die Targetlyse durch die CTLs bevorzugt durch solche Antikörper inhibiert wird, deren antigene Determinanten den jeweiligen Epitop-Bereich auf dem H-$2K^b$ Molekül definieren. Die Experimente zeigen, daß dies nicht der Fall ist. Die Antikörper sind weder Epitop spezifisch in ihrem Verhalten, noch ergeben sich unterschiedliche Inhibitionskurven hinsichtlich der Systeme, in denen die CTLs erzeugt wurden. So stimmen die Inhibitionsmuster von alloreaktiven CTLs (B10.D2 anti C57BL/6) fast völlig mit denen von restringierten (Minor) CTLs (C3H.SW anti C57Bl/6) und bm anti-B6 CTLs überein.

Einschränkend muß hinzugefügt werden, daß die Experimente, die mit den bm anti-B6 CTLs aus Massenkulturen durchgeführt wurden, von einer Hypothese ausgehen. Es wird für diese Experimente vorausgesetzt, daß die zytotoxischen T-Zellen jeweils nur gegen die Bereiche gerichtet sein sollen, die durch die entsprechenden Aminosäureaustausche verändert wurden. Untersuchungen von Sherman et al, 1982 haben aber auch deutlich gemacht, daß schon eine Aminosäuresubstitution auf dem MHC-Protein genügen kann, um das Molekül so zu verändern, daß neue antigene Determinanten für CTLs entstehen, andere dagegen verloren gehen können. Solche Veränderungen durch Aminosäuresubstitution könnten auch im vorliegenden Fall eingetreten sein. Da die CTLs, die gegen die verschiedenen H-$2K^b$-Mutanten Antigene induziert wurden, aus CTL Massenkulturen stammen, kann nicht ausgeschlossen werden, daß auch andere, als die erwarteten CTLs erzeugt wurden. Wenn die Aminosäuresubstitutionen zu neuen antigenen Determinanten für CTLs führen, können auch Vorläufer-T-Zellen gegen solche Determinanten stimuliert worden sein. Es bleibt also zu bedenken, daß es CTLs gibt, die theoretisch nicht durch die jeweiligen Antikörper , deren antigene Determinanten eine bestimmte Epitopregion charakterisieren, blockiert werden müssen.
Um das Verhalten einer bestimmten zytotoxischen T-Zelle mit nur einer bestimmten antigenen Spezifität in Targetinhibitionsexperimenten untersuchen zu können, wiederholten wir die Experimente mit bm anti-B6 CTLs, die klonal expandiert worden waren. (Siehe Abschnitt 5.3)
Was kann man demnach feststellen im Hinblick auf die Erkennung von Allodeterminanten durch zytotoxische T-Zellen im Vergleich zu der Erkennung der gleichen Determinanten durch monoklonale Antikörper?
Hervorzuheben ist , daß es eine Reihe von Antikörpern gibt, die in allen Targetinhibitionsexperimenten nicht die Lyse der Targets durch die zytotoxischen T-Zellen inhibieren.

Das bedeutet, daß die Epitop-Bereiche, die von den Antikörpern erkannr werden, keine Erkennungsbereiche für CTLs sind. Die Folgerung daraus ist, daß Antikörper und CTLs verschiedene Bereiche auf MHC-Antigenen erkennen (Kuon et al.,1982; Hämmerling et al.,1983).
Auch die Affinität der Antikörperklassen dürfte unseren Erfahrungen nach nicht die unterschiedlichen Blockierungseffekte hervorrufen.
Der Schluß, der aus den Targetinhibitionsexperimenten mit CTLs aus Massenkulturen gezogen werden muß, ist der,daß es nicht ohne methodische Schwierigkeiten möglich ist, zu bestimmen, ob CTL-Erkennungsbereiche auf MHC-Antigenen identisch sind mit den Erkennungsbereichen für Alloantikörper. Man kann vermuten, daß sie es mit großer Wahrscheinlichkeit nicht sind, d.h., alloreaktive und restringierte CTLs erkennen wahrscheinlich andere Erkenneungsbereiche als Allo-Antikörper auf MHC-Antigenen.
Der Grund für die Schwierigkeit, dies nicht mitletzter Bestimmtheit feststellen zu können, ist vor allem darin zu sehen, daß der Mechanismus der Targetinhibition selbst nicht klar ist. Targetinhibition könnte z.B. auch auf sterische Inhibition zurückzuführen sein. Infolgedessen läßt sich nicht genau sagen, ob der Antikörper und die zytotoxische T-Zelle die gleiche Erkennungsregion besitzen, oder ob die Erkennungsstrukturen nur nahe beeinander liegen. Übergreifende sterische Inhibition wurde auch von Ozato und Mitarbeitern kürzlich (1983) für rekombinierte Gene beschrieben.
Andererseits ist es auch denkbar, daß die Bindung eines Antikörpers an das Targetmolekül zu einer Konformationsänderung des MHC-Antigens führt. Bindungsstudien mit Antikörpermolekülen auf Mutantentargets (Hämmerling et al., 1982) zeigen allerdings, daß die Bindung bestimmter Antikörper, die einer Antikörpergruppe zugehören, nicht die Bindung von Antikörpern einer anderen Gruppe auf dem MHC-Antigen beeinflussen. Es ist daher eher denkbar, daß es durch die Bindung von Antikörpern auf dem MHC-Antigen zur Beeinflussung von Erkennungsbereichen für CTLs kommt.

Man muß sich vergegenwärtigen, daß das H-2 Molekül dreidimensional gefaltet ist. Bei den CTL-Erkennungsstrukturen könnte es sich um Proteinbereiche handeln, die nach Kontakt mit anderen Molekülen durch Konformationsänderung veränderbar sind. Es wird im nächsten Kapitel diskutiert werden, daß die Ergebnisse der Hybridgenanalysen sehr für eine solche Vorstellung sprechen. Daß Proteine durch Konformation verändert werden, ist von vielen biologischen Molekülen bekannt. Im Fall der CTL- Erkennung könnte dies bevorzugt dadurch passieren, daß virales Protein, Hapten oder andere Moleküle binden.
Es sollte auch erwähnt werden, daß die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse für das H-2K^b Molekül in Widerspruch zu früheren Experimenten am H-2K^k Protein stehen. Weyand et al., 1981 berichten, daß K^k-spezifische CTL Klone durch H-2K^k spez. Antikörper, die jeweils Spezifität für eine bestimmte Epitop-Region auf dem K^k-Molekül hatten, differentiell blockiert werden konnten. Die antigenen Determinanten für die Antikörper liegen den Autoren zufolge in zwei getrennten Gruppen auf dem Molekül vor. Die Experimente wurden auch mit Hapten (TNP-)spezifischen CTL Klonen durchgeführt, die ebenfalls zu dem Ergebnis führten, daß CTL Klone bevorzugt durch Antikörper der einen oder anderen Antikörpergruppe blockiert werden.
Pircher und Mitarbeiter berichteten ebenfalls kürzlich (1984) von Targetinhibitions-Experimenten mit CTL-Langzeit-Klonen. Die Autoren untersuchten Haptenspezifische Klone, und berichteten, daß es ihnen zumindest in einigen Fällen gelang, Hapten-spez. Klone durch Targetinhibition bevorzugt mit anti-H-2K^b Antikörpern, die einer bestimmten Antikörpergruppe auf dem H-2K^b Molekül zugeordnet werden können, bevorzugt zu blockieren. Es ist schwierig, eine Erklärung dafür zu finden warum in einem Fall die gleichen H-2K^b spez. Antikörper die CTLs bevorzugt inhibieren, in den von mir mit alloreaktiven CTLs gemachten Experimenten aber nicht differentiell inhibieren können. Es ist natürlich möglich, daß es für bestimmte Haptene zu Inhibition der CTLs durch die Antikörper kommt.

Zieht man allerdings die Experimente von Weyand et al. mit in Betracht, in denen Hapten spez. und alloreaktive CTLs untersucht wurden, muß man eher zu dem Schluß neigen, daß CTLs und Antikörper gleiche Erkennungsbereiche auf MHC-Antigen erkennen.

4.3 Limiting Dilution und Targetinhibition

Unter Punkt 4.2 wurde darauf hingewiesen, daß die Experimente mit bm anti-B6 spez. CTLs auch mit klonierten CTLs durchgeführt wurden. CTLs, die klonal expandiert wurden, sollten im Gegensatz zu einem Gemisch von CTLs aus Massenkulturen nur Spezifität für einen bestimmten antigenen Bereich zeigen. Es wurde damit die Erwartung verbunden, auf klonaler Ebene für zumindest einzelne CTL Klone Inhibitionsmuster nach Targetinhibition mit H-2K^b spez. Antikörpern zu finden, die eindeutig zeigen würden, ob CTLs bevorzugt von einer der für das H-2K^b Protein definierten Antikörpergruppen inhibiert werden oder nicht. Die Ergebnisse bestätigten die Erwartung nicht. Die CTL Klone wiesen inhibitionsmuster auf, die mit denen der CTLs aus Massenkulturen sehr ähnlich waren. Für einige wenige Klone könnte ein verändertes Inhibitionsmuster für bestimmte Antikörper vorliegen, es muß aber gleichzeitig betont werden, daß die Untersuchungen mit bm anti-B6 CTL Klonen auf Einzelwertmessungen für jeden Antikörper und Klon beruhen. Der Grund, weshalhalb nur Einzelwerte bestimmt wurden, ist in der Schwierigkeit zu sehen, daß es nicht möglich war, eine Vielzahl von Klonen solange zu expandieren, daß sie alle zur selben Zeit mit bis zu zwölf Antikörpern und zusätzlichen Kontrollen untersucht werden konnten. Es war für ein solches Versuchsprotokoll ausgeschlossen, Duplikat-oder Triplikat Werte zu bestimmen. Die Mehrfachkontrollen, die ebenfalls Einzelwerte darstellen, zeigen allerdings durch ihre gute Übereinstimmung die Genauigkeit der Messungen. Darüberhinaus bestätigen die Einzelwertmessungen ja auch die bereits vorher erhaltenen Ergebnisse, mit Ausnahme einiger weniger möglicher Abweichungen.

4.4 Hybridgen-Analysen

Infolge der Schwierigkeiten, mit Targetinhibitionsexperimenten eindeutig bestimmen zu können, wo CTLs auf MHC-Antigenen definierte Erkennungsstrukturen sehen, wandten wir uns der Methode der Modifikation von H-2 Allelen zu.
Mit dieser Methode, die von Evans und Mitarbeitern (1982) erstmals erfolgreich eingesetzt wurde, wird durch gezielten Austausch von Gensequenzen (Exons) verschiedener H-2 Allele ein neues Hybridgen erhalten (Exon shuffling). Dies Verfahren ermöglicht es, nicht nur die Bindungsstellen von monoklonalen Antikörpern, sondern auch die funktionell wichtigen Erkennungsbereiche für CTLs zu lokalisieren.
Meine Untersuchungen mit alloreaktiven anti $H\text{-}2K^d$, anti $H\text{-}2K^k$ und anti $H\text{-}2K^b$ CTLs, die gegen Targetzellen gerichtet waren, die modifizierte H-2 Antigene exprimierten, führten zu folgenden Ergebnissen:

A) Anti $H\text{-}2K^d$ alloreaktive CTLs erkennen MHC-Antigene auch dann noch, wenn der Transmembranteil (TM) und der zytoplasmatische Teil (CP) modifiziert sind. Experimente mit alloreaktiven anti $H\text{-}2K^b$ CTLs zeigen darüber hinaus, daß auch die Veränderung des zytoplasmatischen Teils alleine keinen Einfluß auf die Erkennung des MHC-Antigens durch die CTLs hat.

B) Wird die $\alpha 3$ Domäne, der Membranteil (TM) und der zytoplasmatische Teil verändert, so sind die anti $H\text{-}2K^d$ CTLs ebenfalls in der Lage, das MHC-Antigen zu erkennen. Die allele Struktur der $\alpha 3$ Domäne hat keinen Einfluß auf die Erkennung der antigenen Erkennungsstruktur durch die $H\text{-}2K^d$ spezifischen allorektiven CTLs.

C) Das MHC-Antigen wird dagegen nicht mehr von den $H\text{-}2K^d$ spez. CTLs erkannt, wenn die $\alpha 1$-Domäne erhalten bleibt, die $\alpha 2, \alpha 3$ Domäne sowie der Membran - und der zytoplasmatische Teil aber gegen die allele Sequenz des $H\text{-}2K^k$ Antigens ausgetauscht werden. Die $\alpha 1$ Domäne reicht

alleine nicht aus, damit die H-2K^d spez. CTLs das MHC-Antigen erkennen

Umgekehrt erkennen auch die H-2K^k spezifischen alloreaktiven CTLs das MHC-Antigen nicht, obwohl außer der $\alpha 1$ Domäne der übrige Teil des Proteins, $\alpha 2$, $\alpha 3$, TM und CP vom H-2K^k Allel gebildet werden. Daraus muß man schließen, daß auch die $\alpha 2$ und $\alpha 3$ Domänen nicht über die Erkennung des MHC-Antigens durch CTLs bestimmen.

D) Zur Erkennung der antigenen Struktur durch H-2K^d CTLs kommt es dagegen, wenn die $\alpha 1$ und $\alpha 2$ Domänen vom H-2K^d Allel stammen, während die $\alpha 3$ Domäne, TM und CP vom H-2K^k Allel sein können.

Aus diesen Ergebnissen wurde für die anti H-2K^d und anti H-2K^k CTLs geschlossen, daß nur die allelen Strukturen, die für die $\alpha 1$ und $\alpha 2$ Domänen kodieren, für die Erkennung des MHC-Antigens durch CTLs verantwortlich sein müssen. Weiterhin muß man folgern, daß die antigene Erkennungsstruktur, welche durch die antigenen Determinanten gebildet wird, beeinflußt wird durch die $\alpha 1$ und die $\alpha 2$ Domäne.

Hinsichtlich der Verteilung und Lage der antigenen Determinanten auf den beiden äußeren Domänen ergeben sich mehrere Möglichkeiten. Die Ergebnisse lassen es in diesem Punkt aber nicht zu, sich für eine der Möglichkeiten definitiv entscheiden zu können.

So ist es denkbar, daß sich sowohl auf der $\alpha 1$ Domäne, als auch auf der $\alpha 2$ Domäne antigene Determinanten befinden, deren Aminosäuresequenz zur Faltung des Proteins und zur Bildung der Antigenen Struktur führt.

Denkbar ist ebenso, daß sich die Determinanten nur auf der $\alpha 1$ Domäne befinden, daß die antigene Struktur aber durch die Aminosäuresequenz der $\alpha 2$ Domäne mit beeinflußt wird.

Der letztere Fall wäre natürlich auch in umgekehrter Weise möglich. Die $\alpha 2$ Domäne trägt die antigenen Determinanten, die antigene Erkennungstruktur für die CTLs wird aber durch die Aminosäuresequenz der $\alpha 1$ Domäne mitbestimmt.
Die Ergebnisse unterstützen sehr stark ein Modell der T-Zellerkennung, das postuliert, daß CTLs Konformationsdeterminanten auf MHC-Molekülen erkennen.
Vergleichende Untersuchungen der Aminosäuresequenzen verschiedener H-2 Antigene (Coligan et al.,1981; Reyes et al., 1981; Maloy et al.,1982) zeigen, daß die Variabilität der Allele sich hauptsächlich auf die Bereiche der $\alpha 1$ und $\alpha 2$ Domänen erstreckt. Experimente von Hämmerling und Mitarbeitern (1982) an Mutantenmäusen ließen die Spekulation zu, daß Erkennungsstrukturen für CTLs auf den beiden äußeren Domänen $\alpha 1$ und $\alpha 2$ liegen könnten, wie sie dies für AK-Determinanten fanden.
Man kann spekulieren, ob CTLs nicht eventuell Bereiche auf den beiden äußeren Domänen erkennen, die durch andere Moleküle, z.B. Virusprotein sehr leicht veränderbar sind, was zur Bildung neuer Konformationsdeterminanten (Neo - Determinanten) und zur anschließenden Stimulierung entsprechender H-2 restringierter CTLs führt.

Die hier von mir dargestellten Ergebnisse für alloreaktive CTLs, die sowohl aus Massenkulturen , als auch aus Klonen stammten, wurden ergänzt und in ihrem Ergebnis unterstützt durch Untersuchungen von Arnold et al.,1984. Diese Gruppe verwendete in ihren Experimenten die gleichen Hybridgen-Linien (hergestellt von Arnold et al.), die auch von mir benutzt wurden. Untersucht wurde von dieser Gruppe der Einfluß der Modifikation von MHC-Antigen im Hinblick auf die Erkennung durch Virus (InfluenzaA) restringierte CTLs. Arnold und Mitarbeiter gelangten zu dem Schluß, daß anti $H\text{-}2K^d$ und anti $H\text{-}2K^k$ Virus restringierte CTLs sowohl die $\alpha 1$ als auch die $\alpha 2$ Domäne benötigen, um die antigene Struktur auf dem Target erkennen und die Zielzelle lysieren zu können.

Die α3 Domäne spielt dabei keine entscheidende Rolle für die Erkennung des MHC-Antigens durch die Virus restringierten CTLS.
Es gibt im Vergleich zu den von mir untersuchten alloreaktiven CTLs allerdings eine Besonderheit für die Virus restringierten CTLs. Obwohl die allele Struktur der α3 Domäne keinen Einfluß darauf hat, daß das MHC-Antigen erkannt wird, finden Arnold und Mitarbeiter aber auf der serologischen Ebene den Effekt, daß Targets, die noch alle drei äußeren Domänen vom K^d-Phänotyp exprimieren besser lysiert werden, als Zielzellen, die nur noch die α1 Domäne und die α2 Domäne vom H-$2K^d$ Allel exprimieren, während der übrige Teil des Proteins, einschließlich der α3 Domäne vom H-$2K^k$ Allel stammt. Da die Experimente mit restringierten T-Zellen aus Massenkulturen durchgeführt wurden, vermuten Arnold und Mitarbeiter, daß es auch T-Zellen gibt, die antigene Determinanten auf der α3 Domäne erkennen, während der überwiegende Teil der Virus restringierten CTLs Determinanten auf den beiden äußeren Domänen erkennt. Dies müßte mit Hilfe von CTL-Klonen, die aus Grenzverdünnungsexperimenten (Limiting Dilution) stammen, geklärt werden können. Unter den von mir untersuchten alloreaktiven CTL-Klonen befanden sich solche Klone, die auch Determinanten auf der α3 Domäne erkennen, bisher nicht.

Die Ergebnisse für die alloreaktiven CTLs, als auch für die Virus (Influenza) restringierten anti H-$2K^d$ und anti H-$2K^k$ CTLs zeigen übereinstimmend, daß die α1 und die α2 Domänen die entscheidende Rolle für die Antigenerkennung durch CTLs spielen.
Auch verschiedene andere Arbeitsgruppen übertrugen andere Hybridgene stabil in Zellen, um die MHC-Antigene auf ihre funktionell wichtigen Bereiche zu untersuchen. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, daß die Gene korrekt transkribiert und translatiert wurden, und daß die Genprodukte als normale Restriktionselemente für CTLs im ^{51}Cr-Zytotoxizitätstest angesehen wurden (Goodenow et al.,1982a; 1982b; Mellor et al., 1982; Margulies et al.,1983).

Evans und Mitarbeiter bestätigen durch ihre Experimente, daß die meisten Allodeterminanten für alloreaktive, als auch für Virus (LCMV und VSV) restringierte CTLs auf den beiden äußeren Domänen liegen.
Andererseits sind die experimentellen Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen untereinander oder im Vergleich zu uns widersprüchlich bis kontrovers. So vertreten Ozato und Mitarbeiter (1983) die Auffassung, daß die antigenen Erkennungsstrukturen für das L^d Antigen auf Domänen liegen, die unabhängig voneinander sind, sich alsobei der Bildung der antigenen Erkennunsstruktur nicht gegenseitig beeinflussen. Dies steht in klarem Widerspruch zu der von uns vertretenen Meinung, daß CTLs antigene Determinanten auf den beiden äußeren Domänen erkennen, die nicht unabhängig voneinander gebildet werden. Für unsere Auffassung sprechen bereits erwähnte Resultate von Sherman et al.,1982, sowie Ergebnisse von de Wall et al.,1983 . Diese Autoren berichten, daß zytotoxische T-Zellen Konformationsdeterminanten auf H-2 Antigen erkennen. Schließlich werden unsere Ergebnisse auch durch Allen und Mitarbeiter(1984) bestätigt, die H-$2K^b$-D^b Hybridmoleküle auf Erkennungsstrukturen für alloreaktive und restringierte CTLs, als auch für monoklonale Antikörper hin untersuchten. Die Autoren kommen zu dem Schluß, daß Allodeterminanten für monoklonale Antikörper, als auch Determinanten für alloreaktive und Virus restringierte (Influenza) CTLs auf den beiden äußeren Domänen $\alpha 1$ und $\alpha 2$ liegen. Die dritte Domäne $\alpha 3$ hat ihnen zufolge nach keinen Einfluß auf die Erkennung der antigenen Erkennungsstruktur durch CTLs, hingegen erkennen die parentalen anti H-$2K^b$- u. anti H-$2D^b$ CTLsdas MHC-Antigen nicht mehr , wenn die $\alpha 1$ oder $\alpha 2$ Domäne verändert wurden. Die Autoren ziehen den Schluß, daß die Domänen $\alpha 1$ u. $\alpha 2$ die antigene Erkennungsstruktur bilden und sich dabei gegenseitig beeinflussen.

Auch die Rolle, die der zytoplasmatische Teil bei der Erkennung des MHC-Antigens durch alloreaktive und Virus-restringierte CTLs spielt, wird von verschiedenen Arbeitsgruppen unterschiedlich bewertet.
Aus meinen Untersuchungen mit alloreaktiven H-2K^b CTLs geht hervor, daß Zellen, die ein MHC-Hybridgen exprimieren, das vom H-2K^b Phänotyp ist, während nur der zytoplasmatische Teil vom H-2K^k Allel kodiert wird, ebenso gut von alloreaktiven CTLs lysiert wird, wie das vollständige H-2K^b MHC-Antigen . Die Veränderung des zytoplasmatischen Bereichs beeinflußt nicht die Erkennung des MHC-Antigens durch die K^b spez. CTLs und die anschließende Lyse der Targetzellen. Zu dem gleichen Ergebnis gelangen auch Arnold und Mitarbeiter (1984) bei ihren Untersuchungen mit Influenza restringierten anti H-2K^b CTLs. Der zytoplasmatische Bereich wurde in diesen Experimenten entweder durch allele Sequenzen des K^d oder des K^k-Alles ausgetauscht.
Für andere Hybridgene und für andere als mit Influenza-Virus infizierte Zellen zeichnet sich dagegen ein widersprüchlichereres Bild ab.
So modifizierten Zuniga et al (1983) die zytoplasmatischen Exons des L^d-Antigens. Die Modifikation bzw. Deletion der zytoplasmatischen Exons hatte keinen Einfluß auf die Erkennung des MHC-Antigens und die Lyse der mit VSV infizierten Zielzellen durch die restringierten CTLs.
Dies Ergebnis steht allerdings in teilweisem Widerspruch zu Untersuchungen von Murre et al.,1984 , die kürzlich berichteten, daß die Deletion bzw. Modifikation der Exons 6, 7 und 8 des L^d-Gens zwar keinen Einfluß auf die Erkennung durch LCMV restringierte CTLs gehabt habe, wohl aber auf die Erkennung und Lyse von VSV infizierten Targets durch VSV restringierte CTLs. Während Zunigas

Ergebnisse für eine MHC-Erkennung durch VSV-restrin - gierte CTLs sprechen, die unabhängig ist vom zytoplasmatischen Teil, deuten die Untersuchungen von Murre und Mitarbeitern darauf hin, daß die MHC-Erkennung durch die gleichen Virus restringierten CTLs auch abhängig sein kann vom zytoplasmatischen Bereich.

Aus den bisherigen Untersuchungen mit Hybridantigenen wird deutlich, daß man aus der Untersuchung eines modifizierten Hybridgens noch nicht verallgemeinernd auf die Erkennung anderer MHC-Antigene durch alloreaktive und Virus restringierte CTLs schließen kann.
Obwohl unsere Ergebnisse sehr für ein Modell sprechen, das postuliert, daß CTLs Konformationsdeterminanten auf MHC-Antigenen erkennen, können wir aber auch keine definitive Aussage machen, ob die Erkennung der antigenen Struktur zwei Rezeptoren erfordert (Dual recognition, Abb. 4a) oder nur einen Rezeptor (altered self, Abb. 4b).

4.5 Weitere Perspektiven

Die Methode der Konstruktion von Hybridgenen eröffnet die Möglichkeit, H-2 Antigene eingehender analysieren zu können.
Da die bisherigen Versuche, bei denen Hybridgene mit alloreaktiven oder verschiedenen Virus restringierten CTLs untersucht wurden, zum Teil sehr widersprüchlich sind, wird es eine Aufgabe in der Zukunft sein, noch weitere Hybridantigene herzustellen und zu analysieren.
Der Austausch von allelen Bereichen von H-2 Molekülen und die daraus resultierenden modifizierten MHC-Antigene können auch darauf hin untersucht werden, wo sich die Determinanten für Antikörper auf den Domänen befinden.
Weiterhin wäre es möglich, kleinere Aminosäurebereiche auf den $\alpha 1$ und $\alpha 2$ Domänen zu substituieren und dann zu untersuchen, welchen Einfluß diese Veränderungen auf die Erkennung des MHC-Antigens durch CTLs haben, oder welchen Einfluß die Veränderungen auf die Bindung von Antikörpern ausüben.
Schließlich kann man spekulieren, ob die Erfahrungen mit der Konstruktion von Hybridmolekülen nicht auch die Möglichkeit eröffnen, andere als nur immunologisch relevante biologische Prozesse zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Der MHC-Komplex der Maus ist der inzwischen am besten untersuchte Genkomplex, der auch ganz allgemein am meisten zum Verständnis der zellulären Interaktionen und Erkennungsvorgänge im Immunsystem beigetragen hat. Daher ist es erstaunlich, wie wenig immer noch darüber bekannt ist, wie MHC-Antigene von Zellen des Immunsystems, z.B. Antikörpern oder zytotoxischen T-Zellen erkannt werden. Es ist bis heute nicht klar, wie die antigenen Erkennungsstrukturen von zytotoxischen T-Zellen auf MHC-Antigenen aussehen, noch, wo diese Erkennungsstrukturen im einzelnen lokalisiert sind.
Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen,

1.) ob MHC-Antigene über spezielle Erkennungsbereiche verfügen, die von Antikörpern und zytotoxischen T-Zellen erkannt werden
2.) ob diese Erkennungsbereiche für Antikörper und zytotoxische T-Zellen identisch sind, oder ob Antikörper und CTLs unterschiedliche Erkennungsbereiche auf MHC-Antigen sehen.
3.) wo genau auf den äußeren Domänenen des MHC-Antigens die Erkennungsstrukturen für CTLs liegen, und
4.) ob sich die Domänen gegenseitig durch Konformation beeinflussen, und ob dies Auswirkung auf die Funktion, d.h. die Erkennung des MHC-Antigens durch CTLs hat, bzw. auf die damit verbundene Lyse des Targets.

Die Untersuchungen ergaben, daß MHC-Antigene über spezifische Erkennungsstrukturen für Antikörper (Hämmerling et al.,1984) und für zytotoxische T-Zellen (CTLs) verfügen.
Aus den vergleichenden Analysen für monoklonale Antikörper und CTLs wurde geschlossen, daß Antikörper und CTLs vermutlich unterschiedliche Bereiche auf MHC-Antigenen erkennen.

Es war mit den Targetinhibitions-Experimenten aber nicht möglich zu bestimmen, wo genau auf den äußeren Domänen die Erkennungsstrukturen, insbesondere für zytotoxische T-Zellen liegen.
Aus diesem Grunde wurden die Experimente auf Untersuchungen mit H-2K^d-K^k und H-2K^b-K^k Hybridgen transfizierte Zellen ausgedehnt. Die MHC-Hybridgene wurde erhalten, indem allele Sequenzen des H-2K^d Allels gegen Teile des H-2K^k Allels ausgetauscht wurden, und die äußeren Domänen oder auch der zytoplasmatische Bereich (H-2K^b-K^k Kombination) nach belieben verändert werden konnten (Arnold et al., 1984).
Experimente mit diesen modifizierten MHC-Antigenen und alloreaktiven CTLs aus Massenkulturen, oder aus CTL-Klonen, führten zu fogenden Ergebnissen im Hinblick auf die Erkennung des MHC-Antigens durch die alloreaktiven CTLS:

a) die $\alpha 2$ und die $\alpha 3$ Domänen auf dem MHC-Antigen werden für sich alleine nicht durch die CTLs erkannt.
b) die äußere Domäne $\alpha 1$ alleine reicht ebenfalls nicht aus, um Erkennung und Lyse der Zielzelle hervorzurufen.
c) die allele Struktur der $\alpha 3$ Domäne spielt ebenfalls keine Rolle für die CTL-Erkennung.
d) die Zielzellen werden erkannt und lysiert, wenn die $\alpha 1$ Domäne und die $\alpha 2$ Domäne unverändert , d.h. syngen erhalten bleiben .
e) Modifizierung des zytoplasmatischen Bereich hat keinen Einfluß auf die Erkennung der äußeren Domänen $\alpha 1$ und $\alpha 2$ durch die CTLs.

Die Ergebnisse für die H-2K^d und H-2K^k , sowie für die H-2K^b (zytoplasmatischer Bereich)CTL zeigen, daß die antigenen Determinanten auf den äußeren Domänen $\alpha 1$ und $\alpha 2$ nicht unbeeinflußt von einander gebildet werden.

Hinsichtlich der Verteilung der antigenen Determinanten auf den beiden äußeren Domänen ergeben sich mehrere Möglichkeiten. Die Ergebnisse lassen es in diesem Punkt aber nicht zu, sich für eine der Möglichkeiten definitiv entscheiden zu können.
So ist es denkbar, daß sich sowohl auf der $\alpha 1$ Domäne, als auch auf der $\alpha 2$ Domäne antigene Determinanten befinden, deren Aminosäuresequenz zur Faltung des Proteins und zur Bildung der antigenen Erkennungsstruktur für die CTLs führt. Denkbar ist ebenso, daß sich die Determinanten nur auf der $\alpha 1$ Domäne befinden, daß die antigene Erkennungsstruktur aber durch die Aminosäuresequenz der $\alpha 2$ Domäne mit beeinflußt wird.
Schließlich wäre auch der umgekehrte Fall möglich. Die $\alpha 2$ Domäne trägt die antigenen Determinanten, die antigene Erkennungsstruktur für die CTLs wird aber durch die Aminosäuresequenz der $\alpha 1$ Domäne mitbeeinflußt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen für ein Modell der Antigenerkennung durch CTLs, das postuliert, daß CTLs Konformationsdeterminanten erkennen. Möglicherweise erkennen CTLs Bereiche, die durch andere Moleküle, z.B. Virusproteine, Haptene etc. sehr leicht veränderbar sind, was zur Bildung neuer Konformationsdeterminanten (Neo-Determinanten) und zur Stimulierung entsprechender H-2 restringierter CTLs führt.
Die hier dargestellten Ergebnisse können auch die bisher nicht geklärte Frage entscheiden, ob die Erkennung der antigenen Struktur durch die CTLs zwei Rezeptoren erfordert, (Dual recognition, Abb. 4a) oder nur einen Rezeptor für eine Neo-Determinante (altered self). Die Ergebnisse sprechen für das letztere Modell.

6 Literaturverzeichnis

Acuto, O., Hussey, R.E., Fitzgerald, K.A., Protentis, I.P. Meuer, S.C., Schlossmann, S.F. und Reinherz, E.L. The Human T cell Receptor: Appearance in Ontogeny and Biochemical Relationship of α and ß subunits on IL-2 Dependent Clones and T Cell Tumors. Cell 34: 717-726 (1983)

Allen, H., Wraith,D., Pala, P., Askonas, B., & Flavell,R.A. Domain interactions of H-2 class I antigens alter cytotoxic T-cell recognition sites Nature 3o9: 279-281 (1984)

Allison, J.P., McIntryre, B.W. und Bloch, D. Tumor specific antigen of murine T-lymphoma defined with monoclonal antibody. J. Immunol. 129: 2293-2300 (1982)

Arnold, B., Burger, H.-G., Hamann, U., Hämmerling, G.J., Kees, U., und Kvist, S. Functional Studies On Genetically Engeneered H-2-Antigens: Cytolytic T-Cells Recognize The Two N-Terminal Domains Of H-2 Antigens In Tandem In Influenza A-Infected Cells. Cell , im Druck (August 1984)

Arnold,B., Burgert,H.-G., Archibald,A. DNA sequence of a genomic H-2K^k clone. In Präparation

Arnold,B., Kvist, S., Burger, H., Kuon, W. und Hämmerling,G.J. Manipulation of Histocompatibility genes: mapping antibody and killer cell determinants on hybrid concentration antigens. In Präparation

Benacerraf, B. Role of MHC gene products in immune regulation. Science 212: 1229-1238 (1981)

Bevan, M.J. Interaction antigens detected by cytotoxic T cells with the major histocompatibility complex as modifier. Nature 256: 419-421 (1975)

Blanden, R.V. und Ada, G.L. A dual recognition model for cytotoxic T cells based on thymic selection of precursors with low affinity for self H-2 antigens. Scand. J. Immunol. 7:181-190 (1978)

Billingham, R.E. und Brent, L. und Medawer, P.B. "Actively acquired tolerance" of foreign cells. Nature 172: 603 (1953)

Blobel,G. und Dobberstein, B. Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane - bound ribosomes of murine myeloma. J. Cell. Biol. 67: 835-851 (1975)

Bonner, W.M., Hulett, H.R., Sweet, R.G. und Herzenberg, L.A. Rev. Sci. Instr. 43: 404 (1972)

Bonner, W.M. und Laskey, R.A. A film detection method for Tritium-labeled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. Eur. J. Biochem. 46: 83-88 (1974)

v. Boehmer, H. und Adams , P.B. Syngeneic mixed lymphocyte reactions between thymocytes and peripheral lymphoid cells in mice: Strain specificity and nature of target cell. J. Immunol. 110: 376-383 (1973)

Brickel, M.J., Latchman, D.S., Murphy, D., Willison, K., & Rigby, P.W.J. Activation of a Qua/TLa Class I major histocompatibility antigen gene is a general feature of oncogenesis in the mouse. Nature 306: 765-760 (1983)

Cech, T.R., RNA-Splicing: Three Themes with variations. Cell 34: 713-716 (1983)

Coligan, J.E, Kindt, T.J., Uehara, H., Martinko, J. und Nathenson, S.G. Primary structure of a murine transplantation antigen. Nature 291: 35-39 (1981)

Cooper, E.L. L'Evolution de l'Immunité La Recherche 10: 824-833 (1979)

Dausset, J The major histocompatibility complex in human Science 213: 1469-1474 (1981)

Davies, D.A.L., Boyse, E.A. , Old, L.J. und Stockert, E., Mouse Isoantigens: Separation Of Soluble TL (Thymus-Leukemia) Antigens From Soluble H-2 Histocompatibility Antigen by Column Chromatography J. Exp. Med. 125: 549-558 (1967)

Dobberstein, B., Garoff, H., Warren, G. und Robinson, P.J. Cell free synthesis and membrane insertion of mouse H-2D^{d} histocompatibility antigen and ß2-microglobulin. Cell 17: 759-769 (1981)

Earle, W.R. J.Nat. Cancer Inst. 4:165 (1943)

Eigen, M. Selforganisation of Matter and the Evolution of Biological Macromolecules. Die Naturwissenschaften 58: 465-523 (1971)

Eigen, M. und Winkler-Oswatitsch, R., Das Spiel Piper: München (1975)

Eigen, M. und Schuster, P. The Catalytic Hypercycle - a Principle of Self-Organisation (Part A) Die Naturwissenschaften 64: 541-564 (1977)

Evans, G.A., Margulies, D.H., Shykind, B., Seidman, J.G. und Ozato, K. Exon shuffling: mapping polymorphic determinants on hybrid mouse transplantation antigens. Nature 300: 755-757 (1980)

Falk, W., Männel., D. und Dröge, W. Aktivation of cytotoxic T-Lymphozytes reqires at least two spleen cell derived helper factors besides IL-2. J. Immunol. 130: 2214-2218 (1983)

Fischer-Lindahl, K. und Lemke, H. Inhibition of killer target cell interaction by monoclonel anti-H-2 antibodies. Eur. J. Immunol. 9: 1469-1474 (1979)

Fischer-Lindahl, K. und Hausmann, B. Qued-1 - a target for unrestricted killing by T cells. Eur. J. Immunol. 10: 289-298 (1980)

Flaherty, L., Zimmerman, D. und Sullivan, K.A. Qua-2 and Qua-3 antigens on lymphocyte subpopulations I. Mitogen Responsiveness . J. Immunol. 121: 1640-1643 (1978)

Frischauf, A.M., Garoff, H. und Lehrach,H. A subcloning strategy for DNA sequence analysis. Nucleic Acids Research 23: 5541-5549 (1980)

Glansdorf , P. und Prigogine, I. Thermodynamics of Structure, Stability and Fluctuations. Wiley-Interscience, New York (1971)

Golub, E.S., Idiotypes and the Network Hypothesis Cell 22: 641-642 /1980)

Gonwa, T.A., Peterlin, B.M. und Stobo, J.P. Human Ir Genes: Structure and Function . Adv. Immunol. 34: 71-96 (1983)

Goţer, P.A. J. Pathol. Bacteriol. 47: 231-252 (1938)

Goodenow, R.S., McMillen, M., Örn, A., Nicolson, M., Davidson, N., Frelinger, A.J. und Hood, L. Identification of a BALB/c H-2L^{d} gene by DNA-mediated gene transfer. Science 215: 677-679 (1982a)

Goodenow, R.S., McMillen, Nicolson,M., Sher, B.T., Eakle, K., Davidson, N. und Hood, L. Identification of the class I genes of the mouse major histocompatibility complex by DNA-mediated gene transfer. Nature 300: 231-237 (1982b)

Götze, D. (ed.) The Major Histocompatibility System in Man and Animals Springer-Verlag,Berlin (1977)

Greenwood, F.C., Hunter, W.M. und Glower, S.S., Biochem. J., 89: 114 (1963)

Haken, H. Synergetics. An Introduction. Noneequilibrium Phase Transitions and Self-Organisation in Physics. Chemistry and Biology. Springer-Verlag, Berlin (1978)

Haskins, K., Kubo, R., White, J., Pigeon, M., Kappler, J. und Marrack, P. The major histocompatibility complex restricted antigen receptor on T-cells. I. Isolation with a monoclonal antibody. J. Exp. Med. 157: 1149-1169 (1983)

Hämmerling, G.J., Hämmerling, U. und Flaherty, L. Quat-4, Quat-5, New Murine T Cell Antigens Governed By The TLa Region And Identified By Monoklonal Antibodies. J.Exp. Med. 150: 108-116 (1979)

Hämmerling, G.J., Rüsch, E., Tada, N., Kimura, S. und Hämmerling, U. Localization of allodeterminants on H-$2K^b$ antigens determined with monoklonal antibodies and H-2 mutant mice. (Major histocompatibility complex/ antigenic structure). Proc. Nat. Acad. Sci. 79: 4737 - 4741 (1982)

Hämmerling, G.J., Kuon,W. und Rüsch, E. Distinct Recognition Sites on Histocompatibility Antigens for Antibodies and Cytotoxyc T Lymphocytes. In: 13th International Cancer Congress (Seattle), Part B. Alan R. Liss, Inc., Scientific Medical, and Scholary Publications, p. 375 -385 (1983)

Hedrick, S.M., Cohen, D.I,, Nielsen, E.A. & Davis, M.M. Isolation of cDNA clones encoding T-cell-specific membrane-associated proteins. Nature 308: 149-153 (1984) a

Hedrick, S.M., Nielsen, E.A., Kavaler, J., Cohen, D.I.& Davis, M.M. Sequence relationships between putative T-cell receptor polypeptides and immunoglobulins. Nature 308: 153-158 (1984)

Herzenberg, S.M., Sweet, R.G. und Herzenberg, L.A. Fluorescence Activated Cell Sorting Sci. Am. 234: 108-117 (1976)

Hildeman , W.H. Immunocompetence and Allogeneic Polymorphism Among Invertebrates Transplantation 27: 1-3 (1979)

Hildeman, W.H., Johnston, I.S. und Jokiel, P.L. Immunocompetence in the lowest metazoan phylum: transplantation immunity in sponges. Science 204: 420-422

Hildeman, W.H., Jokiel,P.L.,Bigger, C.H., Johnston, I.S. Allogeneic Polymorphism And Alloimmune Memory in the Coral Montipera Verrucosa. Transplantation 30: 297-301 (1980)

Hood, L., Steinmetz, M. und Goodenow, R. Genes of the Major Histocompatibility Complex Cell 28: 685-687 (1982)

Hood, L., Steinmetz, M. und Malissen, B. Genes of the major histocompatibility complex of the mouse. Ann. Rev. Immunol. 1: 529-568 (1983)

Jerne, N. K. " The Immune System " Sci. Am. 229: 52-60 (1973)

Jerne, N.K. " Towards a network theory in the immune system ". Ann. Immunol. Inst. Past 125C: 373-389 (1974)

Kappler, J., Kubo, R., Haskins, K., White, J. und Marrack,P. The mouse T cell receptor: comparison of MHC-restricted receptors on two T cell hybrydomas. Cell 34: 727-737 (1983)

Kaufman, J.F., Auffray, C., Korman, A.J., Shackelford, D.A. und Strominger, J. The Class II Molecules of the Human and murine Major Histocompatibility Complex Cell 36: 1-13 (1984)

Kees, U. und Krammer, P.H. Most influenza A virus-specific memory cytotoxic lymphocytes react with antigenic epitopes associated with internal virus determinants. J. Exp. Med. 159: 365-377 (1984)

Kindred, B., und Shreffler, D.C. H-2 dependence of cooperation between T an B cells in vivo. J. Immunol. 109: 940-943 (1972)

Klein, J. H-2 mutations: their genetics and effect on immune functions. Adv. Immunol. 26: 44-146 (1978)

Klein, J. Biology of the mouse histocompatibility complex. Springer-Verlag, Berlin (1975)

Klein, J. The major histocompatibility complex of the mouse. Science 203: 516-521 (1979)

Klein,J. Generation of Diversity of MHC Loci: Implications for T cell Rezeptor Repertoires. In: Fourth International Congress of Immunology; Immunology 80 Vol.1 Acad. Press, London p. 239-253 (1980)

Klein, J., Juretic, A., Baxevanis, C.N, & Nagy, A.Z. The traditional and new version of the mouse H-2 complex Nature 291: 455-460 (1981)

Klein, J., Figueroa, F. und Nagy, Z.A. Genetics of the major histocompatibility complex: the final act Ann. Rev. Immunol. 1: 119-142 (1983)

Kress, M., Glaros, D., Khoury, G. und Jay,G. Alternativ RNA splicing in expression of the H-2K gene. Nature 306: 602-604 (1983)

Kvist, S., Roberts, L. und Dobberstein, B. Mouse histocompatibility gens: structure and organisation of K^d gens. The EMBO J. 2: 245-254 (1983)

Kuon, W., Rüsch, E., Koch, N. und Hämmerling, G.J. CTL and antibodies recognize different antigenic regions on the $H\text{-}2K^b$ molecule Immunobol. 162: 382-383 Vortrag 14. Tagung der Gesellschaft für Immunol., Münster (1982)

Lalanne, J.-L., Cochet, M., Kummer, A.-M., Gachlin, G. und Kourilsky, P. Different exon-intron organisation at 5' part of a mouse classe I gene is used to generate a novel $H\text{-}2K^d$-related mRNA. Proc. Nat. Acad. Sci. 80: 7561-7565 (1983)

Lancki,D.N., Lorber, M.I.,LOken, M.R. und Fitch, F.W. A Clone - Specific Monoclonal Antibody That Inhibits Cytolysis Of A Cytolytic T Cell Clone. J. Exp. Med. 157: 921-935 (1983)

Lee, J. und Trowsdale, J. Molecular biology of the major histocompatibility complex Nature 304: 214-215 (1983)

Lemke, H., Hämmerling, G.J. und Hämmerling, U. Fine specificity analysis with monoclonal antibodies of antigens controlled by the major histocompatibility complex and by the Qa/Tl region in mice Immunol. Rev. 47: 175-206 (1979)

Lemke, H. und Hämmerling, G.J. Clustering of antigenic determinants on H-2 molecules. J. Immunol. 128: 2465-2469 (1982)

Lipinski, M. und Herzenberg, L.A. Les hybridomas et leurs application La Recherche 125: 952-961 (1981)

Marrack, P., Endrés, R., Shimonekevitz, R., Zlotnik, A., Dialynas, D., Fitch, F. und Kappler, J. The major histocompatibility copmplex restricted antigen receptor on T cells. II. Role of the L314 product. J.Exp. Med. 158: 1077-1092 (1983)

Malissen, M., Malissen, B und Jordan, B. Exon/intron organisation and complete nucleotide sequenze of an HLA gene. Proc. Nat. Acad. Sci. 79: 1893-1897 (1982)

Maloy, W.L. und Coligan, J.E. Primary structure of the H-2D^{b} alloantigen. II. Additional amino acid sequence information, localisation of a third site of glycosylation and evidence for K and D region specific sequences. Immunogenetics 16: 11-22 (1982)

Margulies, D.H., Evans, G.A., Ozato, K., Camerini-Otero, D., Tanaka, K., Appella, E. und Seidman, J.G. Expression of H-2K^{d} and H-2L^{d} mouse major histocompatibility antigen genes in L cells after DNA-mediated gene transfer. J. Immunol. 130: 463-470 (1983)

Matzinger, P. A one receptor view of T-cell behaviour Nature 292: 497-501 (1981)

Melief, C.J., De Wall, L.P., Van der Meulen, M.Y., Melvold, R.W. und Kohn, H.I. Fine specificity of allo immune cytotoxic T lymphocytes directed against H-2K. A study with K^{b} mutants. J. Exp. Med. 151: 993-1013 (1980)

Mellor, A.L., Golden, L., Weiss, E., Bullman, H., Hurst, J., Simpson, E., James, R.F.L., Townsend, A.R.M., Taylor, P.M., Schmidt, W., Ferluga, J., Leben, L., Santamaria, M., Atfield, G., Festenstein, H. und Flavell, R.A.
Expression of murine H-2K^b histocompatibility antigen in cells transformed with cloned H-2 genes. Nature 298: 529 - 534 (1982)

Meuer, S.C., Fitzgerald, K.A., Hussey, R.E., Hodgdon, J.C., Schlossman, S.F. und Reinherz, E.L. Clonotypic structures involved in antigen-specific human T-cell function. Rela - tionship to the T3 molecular complex. J.Exp. Med. 157: 709-719 (1983a)

Meuer, S.C., Acuto,D., Hussey, R.E., Hodgdon, J. Fitzgerald, K.A. , Schlossman, S.F. und Reinherz, E.L. Evidenz for the T3 -associated 9oK heterodimer as the T cell antigen receptor. Nature 303: 808-818 (1983b)

McIntyre, K.R., Hämmerling, U. , Uhr, J.W.& Vitetta, E.S. Structural Analysis of Thymus-Leukemia (TL) Antigens in the Mouse. J. Immun. : 1712-1717 (1982)

Michaelson, J., Genetic Polymorphism of ß2-Microglobulin (ß2m) Maps to the H-3 Region of Chromosom 2 Immunogenetics 13: 167-171 (1981)

Murre,C., Reiss, C.S., Bernabeu, C., Chen, L.B., Burakoff, S.J. und Seidman, J.G. Construction, expression and recognition of an H-2 molecule lacking its carboxyl terminus. Nature 307: 432-436 (1984)

Murre, C., Choi, E., Weis, J., Seidman, J.G., Ozato, K., Liu, L., Burakoff, S.J. und Reiss, C.S. Dissection of Serological and Cytolytic T Lymphocyte Epitopes on Murine Histocompatibility Antigens by a Recombinant H-2 Gene Separating the first Two External Domains J. Exp. Med., 1984 (im Druck)

Nabholz, M., Vives, J., Young, H.M., Meo, T., Miggiano, V. Rijnbeek, A. und Schreffler, C. Cell-mediated cell lysis in vitro: genetic control of killer cell production and target specificities in the mouse. Eur. J. Immunol. 4: 378-387(1974)

Nairn, R., Nathenson, S.G., und Coligan, J.E. Isolattion, charakterisation and amino acid sequence studies of the cyanogen bromide fragments of the H-2D^d glycoprotein. Eur. J. Immunol. 10: 495-503 (1980a)

Nairn, R. Yamaga,K. und Nathenson,S.G. Biochemistry of The Gene Products From Murine MHC Mutants. Ann. Rev. Genet.14: 241-277 (1980b)

Nathenson, S.G., Gehara, H., Ewenstein, B.M., Kindt, T.J., und Coligan, J.E. Primary structural analysis of the transplantation antigens of the murine H-2 major histocompatibility complex. Ann. Rev. Biochem. 50: 1025-1052 (1981)

Nicolis, G. und Prigogine, I. Self-Organisation in Nonequilibrium Systems (Wiley-Interscience, New York) Kapitel 7 (1977)

Old, L. et al. Cancer Research 25: 813 (1965)

Ozato, K., Evans, G.A., Shykind, B., Margulies, D.H. und Seidman, J.G. Hybrid H-2 histocompatibility gene products assign domains recognized by alloreactive T cells. Proc. Nat. Acad. Sci. 80: 2040-2043 (1983)

Parker, B.A., und Stark, G.R. Regulation of simian virus 40 transcription : sensitive analysis of the RNA species present early in infections by virus or viral DNA. J. Virol. 31: 360-369 (1979)

Du Pasquier, L. Phylogenesis of the vertebrate immune system. In: The Immune System, 27. Mosb. Coll. (Melchers, Rajewsky eds.), Springer Verlag P. 101 (1976)

Pircher, H., Hämmerling, G.J. und Hengartner, H. Restriction of fine specificity of long-term, hapten-specific cytotoxic T cell clones: analysis with H-2K^{bm}-mutant mice and H-2K^{b} specific monoclonal antibodies. Eur. J. Immunol. im Druck (1984)

Ploegh, H.L., Orr, H.T. und Strominger, J.L. Major Histocompatibility Antigens: The Human (HLA-A, -B,-C) and Murine (H-2K, H-D) Classe I Molecules. Cell 24: 287-299 (1981b)

Reinherz, E.L., Meuer, S.C. und Schlossman, S.F. The Human T Cell Rezeptor: Analysis with Cytotoxic T cell Clones. Immunol. Rev. 74: 83-112 (1983)

Reinherz, E.L., Meuer, S.C., Fitzgerald, K.A., Hussey, R.E., Hodgdon, J.C., Acuto, O. und Schlossman, S.F. Comparison of T3-associated 49 and 43-kilodalton cell surface molecules on individual human T-cell clones: evidence for peptide variability in T-cell receptor structures. Proc. Nat. Acad. Sci. 80: 4104-4108 (1983)

Reiss, C.S., Evans, G.A., Margulies, D.H., Seidman, J.G., und Burakoff, S.J. Allospecific and virus-specific cytolytic T lymphocytes are restricted to the N or C1 domain of H-2 antigens expressed on L cells after DNA-mediated gene transfer. Proc. Nat. Acad. Sci. 80: 2709-2712 (1983)

Riedl, R. Die Ordnung des Lebendigen. Systembedingungen der Evolution Parey, Hamburg-Berlin (1975)

Reyes, A.A., Johnson, M.J., Schöld, M., Ito, H., Ike,Y., Morin, C., Itakura, K. und Wallace, R.B. Identification of an H-2K^b-related molecule by molecular cloning. Immunogenetics 14: 383-392 (1981)

Reyes, A.A., Schöld, M. und Wallace, R.B. The complete amino acid sequence of the murine transplantation antigen D^b as deduced by molecular cloning. Immunogenetics 16: 1-9 (1982)

Robertson, M. The evolutionary past of the major histocompatibility complex and the future of cellular immunology Nature 24 : 29-32 (1982)

Rose, S.M. und Cullen, S.E. A Variant Chain In An Ia Molecule From The I-A Subregion Of The Mouse Major Histocompatibility Complex: A Possible Intragenic Recombination J. Immunol. 127: 1472-1477 (1981)

Rüsch, E., Kuon, W. und Hämmerling, G.J. Target Sites for Antibodies and Cytotoxic T Lymphocytes on H-2 Molecules. Transpl. Proceedings 4: 2093-2096 (1983)

Scofield, V.C., Schlumpberger, J.M., West, L.A. und Weissmann, I.L. Protochordate allorecognition is controlled by an MHC-like gene system. Nature 295: 499-502 (1982)

Sherman, L.A., Recognition of conformational determinants on H-2 by cytolytic T lymphocytes. Nature 297: 511-513 (1982)

Shreffler, D.C. und Owen, R.D. A serologically detected variant in mouse serum: Inheritance an association with histocompatibility - 2 locus. Genetic 48: 9 (19)

Shinohara, N., Sachs, D.H., Nonaka, N. und Yamamoto, H. Phylogenetic tracing of Ia genes. Nature 292: 362-363 (1981)

Simpson , E. und Gordon, R.D. Responsiveness to HY Antigen Ir Gene Complementation and Targer Cell Specificity Transpl. Rev. 35: 59-75 (1977)

Singer, S. J. und Nicolson, G.L. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes Science 175: 720-731 (1972)

Snell,G.D., Studies in Histocompatibility Science 213: 172-178 (1981)

Soloski,M.J., Uhr, J.W., Flaherty, L. & Vitetta, E.S. Qa-2, H-2K and H-2D Alloantigens Evolved From a Common Ancestral Gene J. Exp. Med. 153: 1080-1093 (1981)

Soloski, M.J., Uhr, J.W. & Vitetta, E.S. Primary structural studies of the Qa-2 alloantigen: Implications for the evolution of the MHC. Nature 296: 759-761 (1982)

Southern, P.J. und Berg, P. Transformation of mammalien cells with a bacterial gene under control of the SV40 early promoter region J. Mol. Appl. Genet. 1: 327-341 (1982)

Steinmetz, M., Moore,K.W., Frelinger, J.G., Sher,B.T.,Shen, F.-W., Boyse, E.A. und Hood,L. A Pseudogene Homologous to Mouse Transplantation Antigens: Transplantation Antigens Are Encoded by Eight Exons That correlate with Protein Domains Cell 25: 683-692 (1981)

Steinmetz, M., Minard, K., Horvath, S., McNicholas, J., Srelinger, J., Wake, C., Lang,E., Mach, B. & Hood, L. A molecular map of the immune response region from the major hisocompatibility complex in the mouse Nature 300: 35-42 (1982)

Steinmetz, M. und Hood,L. Genes of the major histocompatibility complex in mouse and man. Science 222: 727-733 (1983)

Taswell, C. MacDonald,H.R., Cerottini,J.C. Limiting dilution analysis of alloantigen reactive T lymphocytes. II. affect of cortisone andcyclophosphamide on cytolytic T-lymphocyte precursor frquencies in the thymus. Thymus 1, 119 (1979)

Vitetta, E.S., Uhr, J.W. und Boyse,E.A. Isolation and Characterisation of H-2 and TL Alloantigens from the surface of Mouse Lymphocytes. Cell Immunol. 4: 187-191 (1972)

De Waal, L., Nathenson, S.G. und Melief, C.J.M. Direct demonstration that cytotoxic T lymphocytes recognize conformational determinants and not primary amino acid sequences. J. Exp. Med. 158: 1720-1726 (1983)

Weiss, E.H., Mellor, A., Gold, L., Fahrner, K., Simpson, E., Hurst, J. & Flavell, R.A. The structure of a mutant H-2 Gene suggests that the generation of polymorphism in H-2 genes may occur by gene conversion-like events Nature 301: 671-674 (1983)

Weyand, C., Hämmerling, G.J. und Goronzy, J. Recognition of H-2 domains by cytotoxic T lymphocytes. Nature 292: 627-628 (1981)

Weyand, C., Goronzy, J. und Hämmerling. G.J. Recognition of polymorphic H-2 domains by T lymphocytes. I. functional role of different H-2 domains for the generation of alloreactive cytotoxic T lymphocytes and determination of precursor frequencies. J.Exp. Med. 154: 1717-1731 (1981)

Wigler, M., Silverstein, S., Lee,L.-S., Pellicer, A., Cheng, H. und Axel, R. Transfer of purified Herpes virus Thmidine kinase gene to cultered mouse cells. Cell 11: 223-232 (1977)

Wigler, M., Pellicer, A., Silverstein, S., Axel, R., Urlaub, G. und Chasin, L. DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyltransferase locus into mammalian cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76: 1373-1376 (1979)

Williams, F.A. The T-Lymphocyte antigen receptor- elusive no more Nature 308: 108-109 (1984)

Winoto, A., Steinmetz, M. und Hood, L. Genetic mapping in the major histocompatibility complex by restriction enzyme site polymorphism: Most mouse classe I genes map to the Tla complex. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80:3425-3429 (1983)

Yanagi, Y., Yoshikai,Y., Leggett, K. Clark, S.P., Aleksander,I. & Mak, T.W. A human T cell-specific cDNA clone encodes a protein having extensive homology to immunglobulin chains Nature 308: 145-149 (1984)

Yokoyama,K. und Nathenson, S.G. Intramolecular organisation of classe I H-2 antigens; localisation of the alloantigenic determinants and the ß2m binding site to different regions of the H-2K^{b} glycoprotein J.Immunol. 130: 1419 - 1425 (1983)

Zinkernagel, R.M. und Doherty, P.C. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomenengitis within a syngeneic or semiallogeneic system. Nature 248: 701-702 (1974a)

Zinkernagel, R.M. und Doherty, P.C. Immunological sur - veillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomenengitis. Nature 251: 547-548 (1974b)

Zinkernagel, R.M. und Doherty, P.C. MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness. Adv. Immunol. 27: 51-177 (1979)

Zuniga, M.C., Malissen, B., McMillan, B., Brayton, P.R., Clark, St.S., Forman, J. und Hood, L. Expression and Function of Transplantation Antigens With Altered or Deleted Cytoplasmic Domains. Cell 34: 535-544 (1983)

Lebenslauf

Name, Vorname :	Kuon, Wolfgang
Geboren :	29.08.1953 in Ahlen/Westf.
Eltern :	German Kuon Elisabeth Kuon, geb. Baumann

Schulausbildung

1960 - 1964	Ludgeri-Volksschule in Lüdinghausen
1964 - 1972	altspr. Gymnaysium-Canisianum in Lüdinghausen
18. 05. 1972	Abitur
1972 - 1973	Wehrdienst

Studium

WS 1973/74	Beginn des Biologie - Diplom Studiums an der Universität Tübingen
1975	Vordiplom
1978	Diplom-Prüfung Hauptfach: Mikrobiologie Nebenfächer: Biochemie, Genetik, Zoologie
1978 - 1979	Diplomarbeit am Max-Planck-Inst. für Biologie/Abt. Immungenetik bei Prof. Dr. J. Klein
1980 - 1984	Dissertation am Inst. für Immunologie und Genetik am Deutschen Krebsfor - schungszentrum in Heidelberg bei Prof. Dr. G.J. Hämmerling
01. August 1984	Promotionsprüfung am Inst. für Mikro-biologie der Universität Tübingen

Meine akademischen Lehrer waren:

in Tübingen:	Ammermann, Bessler, Braun, Götze, Grell, Hemleben, Jung, Loeffler, Klein, Kulzer, Mecke, Seyffert, Seiler, Sperlich, Wöhrmann, Zähner
in Heidelberg:	Dröge, Eichmann, Graf, Hämmerling, Krammer, Schirrmacher

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45